N° d'ordre : 311

N° D'ENREGISTREMENT AU C.N.R.S
A.O. 1982

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Hélène RICHARD

Contribution à l'étude de l'évolution des systèmes :
"Renaturation" du DNA en présence d'ions cuivriques et zinciques.

Soutenue le 24 novembre 1970, devant la Commission d'Examen :

M. A. MARCHAND	Président du Conseil Transitoire de Gestion de la Faculté des Sciences de Bordeaux	*Président*
M. A. PACAULT	Membre correspondant de l'Institut, Professeur ...	*Examinateurs*
M. M. MAGAT	Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay	
M. M. DAUNE	Professeur à la Faculté des Sciences de Strasbourg.	

— 1970 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543508_0005

N° d'ordre : 311

N° D'ENREGISTREMENT AU C.N.R.S
A.O. 1982

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Hélène RICHARD

Contribution à l'étude de l'évolution des systèmes :
"Renaturation" du DNA en présence d'ions cuivriques et zinciques.

Soutenue le 24 novembre 1970, devant la Commission d'Examen :

M. A. MARCHAND	Président du Conseil Transitoire de Gestion de la Faculté des Sciences de Bordeaux	*Président*
M. A. PACAULT	Membre correspondant de l'Institut, Professeur ..	*Examinateurs*
M. M. MAGAT	Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay	
M. M. DAUNE	Professeur à la Faculté des Sciences de Strasbourg.	

— 1970 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Université
de Bordeaux

—

FACULTE DES SCIENCES

Doyens honoraires : M. BRUS
M. CALAS

Président du Conseil Transitoire de Gestion : M. MARCHAND

Professeurs honoraires :

M. KASTLER..... Professeur à la Sorbonne
M. PISOT..... Professeur à la Sorbonne
Mlle JOSIEN..... Professeur à la Sorbonne
M. MILLOUX
M. CAU
M. GENEVOIS

Professeurs :

M. ROGER..... Mécanique rationnelle
M. WEILL..... Anatomie comparée et embryogénie
M. DUFRESNOY..... Mathématiques générales
M. LAFON..... Physiologie générale
M. BOUNHIOL..... Biologie animale
M. SERVANT..... Physique
M. CALAS..... Chimie organique
M. GAY..... Cristallographie et minéralogie
M. PACAULT..... Chimie physique
M. DAVID..... Physiologie végétale
M. BLAIZOT..... Physiologie de la nutrition
M. COLMEZ..... Méthodes mathématiques de la Physique
M. CAMBAR..... Biologie animale
M. VIGNEAUX..... Géologie
M. PANOUSE..... Zoologie
M. ARZELIES..... Physique (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
M. RIBEREAU-GAYON..... Oenologie et chimie agricole
M. RISS..... Mathématiques
M. HAGET..... Zoologie expérimentale
M. CHASTEL..... Physique nucléaire
M. HAGENMULLER..... Chimie minérale
M. CREAC'H..... Biologie animale
M. LOUDETTE..... Mécanique physique
M. PATY..... Chimie
M. BORDES..... Préhistoire
M. SECHET..... Botanique
M. BAGANAS..... Mathématiques
M. VALENTIN..... Radioélectricité
M. EYME..... Botanique
M. RUAMPS..... Physique électronique
M. FRAINNET..... Chimie organique
M. HOARAU..... Chimie physique

M. MARCHAND	Chimie
M. LALANDE	Chimie appliquée
M. GOTTIS	Géologie dynamique
M. LEMANCEAU	Chimie
M. CARDO	Psychophysiologie
M. ROCH	Physique
M. BELLON	Chimie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
M. CLASTRE	Cristallographie physique
M. JOUSSOT-DUBIEN	Chimie
M. VALADE	Chimie organique
M. SURDIN	Automatique
Mlle LAFFITTE	Physique
M. CLIN	Géologie
M. DESTRIAU	Chimie
M. BOTHOREL	Chimie
M. BLONDEL	Mathématiques
M. LOCHET	Physique
M. LASCOMBE	Chimie
M. RIMPAULT	Physique théorique
M. ANDRE	Zoologie et physiologie animale
M. AUROUZE	Hydrogéologie
M. HAUGAZEAU	Informatique
M. FRESNEL	Calcul infinitésimal
M. MURAOUR	Océanographie
M. SIMONOFF	Radiochimie
M. SOURISSEAU	Chimie
M. VINDT	Biologie végétale
M. REGNIER	Mathématiques
M. BARAUD	Chimie biologique
M. PETIT	Physique corpusculaire
M. EMBERGER	Géologie
M. CHARRU	Physique
M. BARETS	Biologie animale
M. PINEAU	Chimie
M. LEVEQUE	Géologie approfondie
M. BOUSSEAU	Physique
M. MENNRATH	Physique
M. BOUAS-LAURENT	Chimie organique
M. RIBEREAU-GAYON P.	Chimie oenologique
Mlle DUTRIEU	Physiologie animale
M. MOYES	Géologie
M. BERNET	Génétique
M. LUTZ	Botanique
M. MOULINES	Chimie
M. POUCHARD	Chimie minérale
M. DRESS	Mathématiques
M. ARTOLA	Mathématiques
M. MENDES-FRANCE	Mathématiques
M. N.	Astronomie
M. N.	Physique générale
M. N.	Biochimie

Maître de conférences honoraire :

M. DE PUYMALY

Maîtres de conférences :

Mme PETIT	Physique
M. SARDOS	Physique
M. DUMERY	Mécanique
M. LESCA	Mathématiques
M. MARTINET	Mathématiques
M. BOUARD	Biologie végétale
M. MINNAERT	Physique théorique
M. ABGRALL	Physique théorique
M. DE MATHAN... suppléé par M. DAMEY	Mathématiques
M. BOISSEAU	Biologie générale
M. NASLAIN	Chimie minérale
M. ONILLON	Chimie minérale
M. HOGBE	Mathématiques
M. KLINGEBIEL	Géologie
M. BOUCHET	Informatique
M. GEORGES	Physique du solide
M. JOLY	Informatique
M. N	Physique
M. N	Biophysique

Conseiller Administratif :

M. LLORENS

- AVANT-PROPOS -

Une grande partie de cette étude a été réalisée au Centre de Recherches Paul Pascal sous la direction de Monsieur le Professeur A. PACAULT. Il m'a très souvent aidée en m'apportant à la fois la clarté de sa pensée scientifique et son soutien moral. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma sincère reconnaissance et mon respectueux attachement.

Monsieur le Professeur M. DAUNE, biophysicien au Centre de Recherches sur les Macromolécules (Strasbourg) a bien voulu, en m'intégrant à son équipe de recherches pendant quelques mois, s'intéresser à mon travail et diriger plus particulièrement l'étude des mécanismes. Je lui adresse mes sincères remerciements non seulement pour cela mais aussi pour l'excellent accueil qu'il m'a réservé.

Monsieur le Professeur M. MAGAT, de la Faculté des Sciences d'Orsay, a accepté de venir juger ce mémoire, qu'il me soit permis de lui exprimer mes plus vifs remerciements.

Monsieur le Professeur A. MARCHAND a pu suivre ce travail lors de son élaboration : qu'il soit également remercié sincèrement.

Au cours de la réalisation expérimentale, Eliane DUPART, ingénieur au C.N.R.S., m'a fait bénéficier de son aide compétente et amicale.

Le personnel des ateliers verre et mécanique, sous les directions respectives de MM. DUFFOUR et PIAUD, a aussi contribué à la recherche des meilleures conditions expérimentales. Quant à la présentation de ce mémoire, elle n'aurait pas été possible sans la participation de C. CARRERE et Ch. TARDAN ainsi que J. MOINEAU et R. CANET. Nous adressons à toutes et à tous nos remerciements les plus chaleureux.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'EVOLUTION DES SYSTEMES :

RENATURATION DU DNA EN PRESENCE D'IONS CUIVRIQUES

ET ZINCIQUES

- SOMMAIRE -

Pages

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE I - REGLE PHENOMENOLOGIQUE D'EVOLUTION DES SYSTEMES..... 9

1) ENONCE..... 9

2) CHOIX DE SYSTEMES..... 11

CHAPITRE II - METHODES D'ETUDE DES CHANGEMENTS DE STRUCTURE DU DNA..... 17

1) DEFINITIONS..... 17

2) AGENTS DENATURANTS..... 18

3) AGENTS RENATURANTS..... 19

4) TECHNIQUES D'ETUDE DU DNA..... 20

5) TECHNIQUES DE "DENATURATION" ET "RENATURATION" DES SOLUTIONS CUIVRIQUES ET ZINCIQUES DU DNA..... 29

CHAPITRE III - RESULTATS EXPERIMENTAUX - ANALYSE PHENOMENOLOGIQUE.... 41

1) ILLUSTRATION DE LA REGLE..... 43

2) ETUDE D'AUTRES SYSTEMES..... 52

3) UTILISATION D'UNE AUTRE PROPRIETE : DOSAGE DES IONS Cu^{++} AU COURS DE LA "RENATURATION" DU DNA..... 78

4) PRECISION ET REPRODUCTIBILITE DES MESURES..... 80

CHAPITRE IV - DISCUSSION DES RESULTATS ET DE LEUR ANALYSE PHENOMENOLOGIQUE..... 87

1) REFLEXIONS SUR LA NOTION DE SYSTEME..... 88

2) REFLEXIONS SUR LE CHOIX D'UNE PROPRIETE P..... 89

3) SYSTEMES EQUIVALENTS..... 93

4) MISE EN EVIDENCE DE SYSTEMES DIFFERENTS..... 95

5) LES SOLUTIONS CUIVRIQUES ET ZINCIQUES DES MEMES DNA EVOLUENT SUIVANT DES COURBES DIFFERENTES..... 96

6) PERSPECTIVES..... 98

CHAPITRE V - ETUDE DE SOLUTIONS CUIVRIQUES ET ZINCIQUES DE DNA
A L'ETAT STATIQUE..... 99
1) INTRODUCTION..... 99
2) MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE..... 101
3) RESULTATS EXPERIMENTAUX..... 105
4) CONCLUSION..... 120

CHAPITRE VI - ROLE DE L'AGENT RENATURANT DES SOLUTIONS CUIVRIQUES.... 121
1) RESULTATS..... 122
2) CONCLUSION..... 123

CHAPITRE VII - DETERMINATION D'UNE FONCTION $\alpha = \phi(t)$..... 126

CHAPITRE VIII - MODELES ET MECANISME..... 133
1) DESCRIPTION DES MODELES DANS LES DIFFERENTS ETATS D'EQUILIBRE..... 132
2) JUSTIFICATION DES MODELES..... 135
3) MECANISME..... 139
4) RELATION ENTRE CE MECANISME ET LA LOI $\alpha = \phi(t)$..... 141

CONCLUSION..... 143

BIBLIOGRAPHIE..... 145

INTRODUCTION

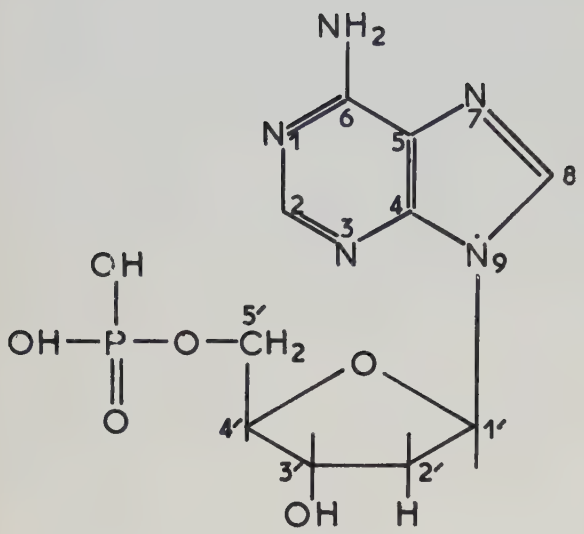
1)

Dans le cadre d'une étude générale de l'évolution des systèmes, une règle phénoménologique a été autrefois proposée (15) et il est apparu nécessaire de choisir pour l'infirmer ou la confirmer des systèmes les plus différents possibles. Nous avons choisi le système constitué par l'acide désoxyribonucléique (DNA) et certains ions métalliques.

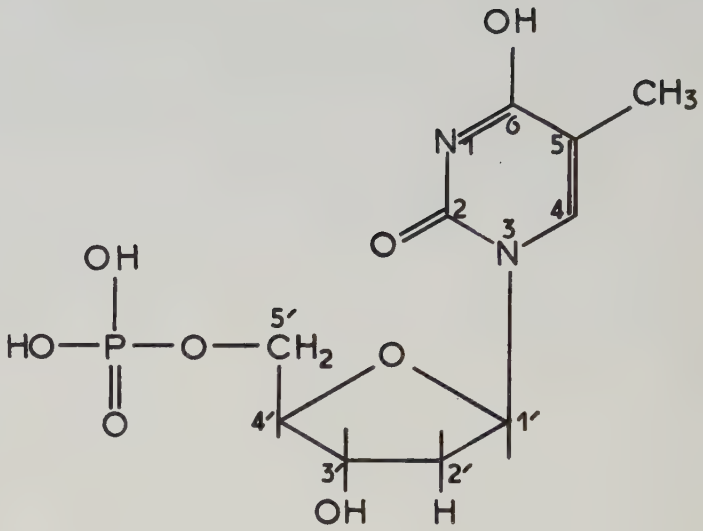
L'évolution de ce système dépendant d'un assez grand nombre de variables, son étude est favorable à l'illustration de la règle précédemment citée et de ses conséquences : l'analyse du dénombrement des variables indépendantes agissant sur l'évolution du système, la synthèse d'un ensemble de résultats et enfin la prévision de l'évolution du système dans des conditions non encore expérimentées.

Ce système est aussi d'intérêt biologique et à ce titre ses possibilités d'évolution joueraient un rôle important si on les étudiait dans des conditions compatibles avec la vie.

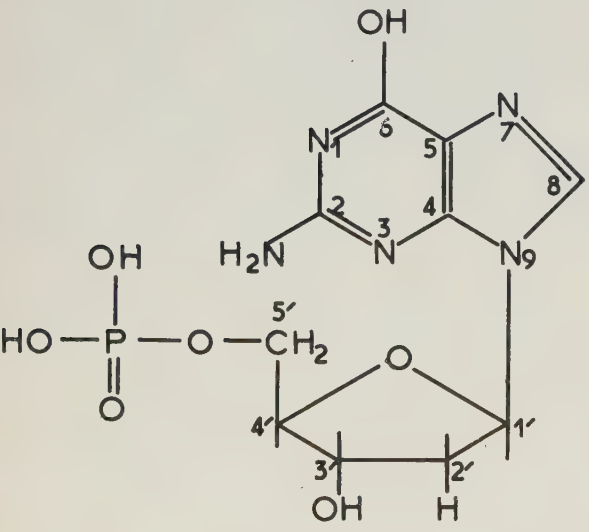
Délaissant ces conditions limitées, nous avons d'abord développé la phénoménologie de la "renaturation" du DNA en présence d'ions Cu^{++} ou Zn^{++}. Puis à cette première démarche méthodologique nous avons associé la recherche complémentaire d'un modèle illustrant un mécanisme.



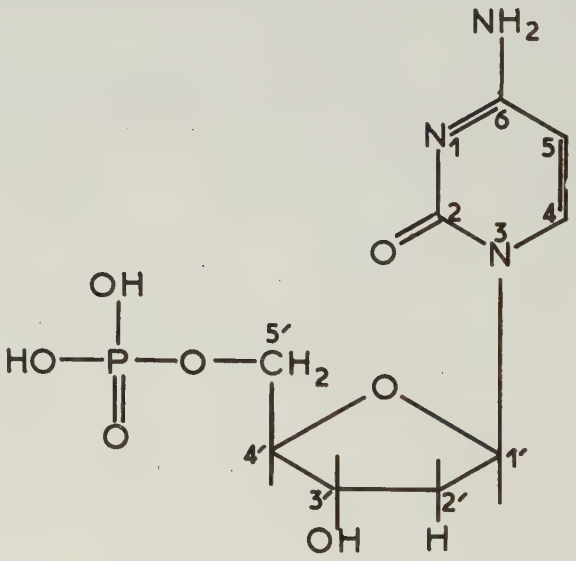
Désoxyadénosine - 5′ - phosphate



Désoxythymidine - 5′ - phosphate.



Désoxyguanosine - 5′ - phosphate



Désoxycytosine - 5′ - phosphate

Fig. 1

2)
GENERALITES - STRUCTURE DU DNA

21) *Définition des constituants*

Le DNA est une macromolécule linéaire dont la masse moléculaire peut atteindre plusieurs millions. Elle est formée par l'enchaînement dans un ordre quelconque des quatre nucléotides suivants : (fig. 1)

(I) Adénosine - 5' - Monophosphate
(II) Thymidine - 5' - Monophosphate
(III) Guanosine - 5' - Monophosphate
(IV) Cytidine - 5' - Monophosphate

Chacun de ces composés possède le groupement phosphate et le sucre désoxyribose ; ils diffèrent seulement par la nature des bases azotées liées au sucre en 1'. Ces bases sont : l'adénine, la thymine, la guanine et la cytosine. Les nucléotides sont unis entre eux par des liens 3' - 5' phosphodiesters (fig. 2) (1).

22) *Structure de WATSON et CRICK*

Deux brins de polynucléotides sont enroulés en hélice de façon telle que les phosphates soient à l'extérieur de l'hélice et les bases à l'intérieur de celle-ci. Les bases sont empilées de façon régulière parallèlement les unes aux autres et perpendiculairement à l'axe de l'hélice ; elles sont distantes de 3,36 $\mathring{A}$, et l'angle entre deux bases adjacentes vaut 36°. Le diamètre et le pas de l'hélice sont respectivement de 20 $\mathring{A}$ et 33,6 $\mathring{A}$ (2). Il y a 10 nucléotides par tour d'hélice.

Un couplage spécifique des bases azotées assure la liaison entre les deux chaînes. Les paires de bases observées dans le DNA sont : adénine-thymine (A - T) et guanine-cytosine (G - C) (fig. 3).

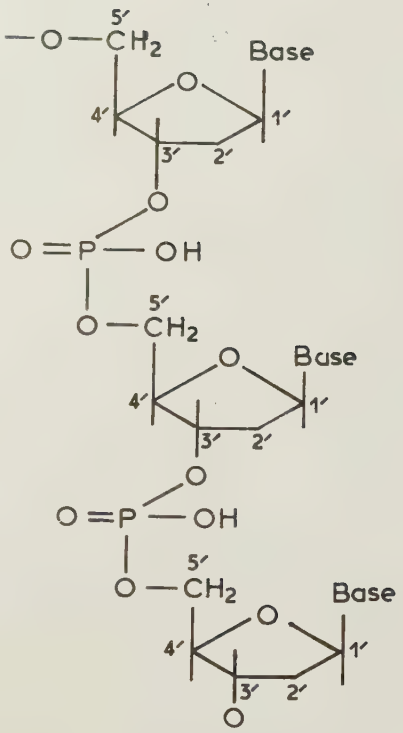
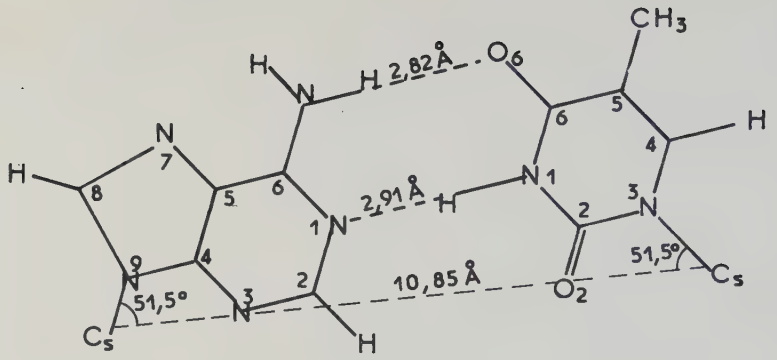
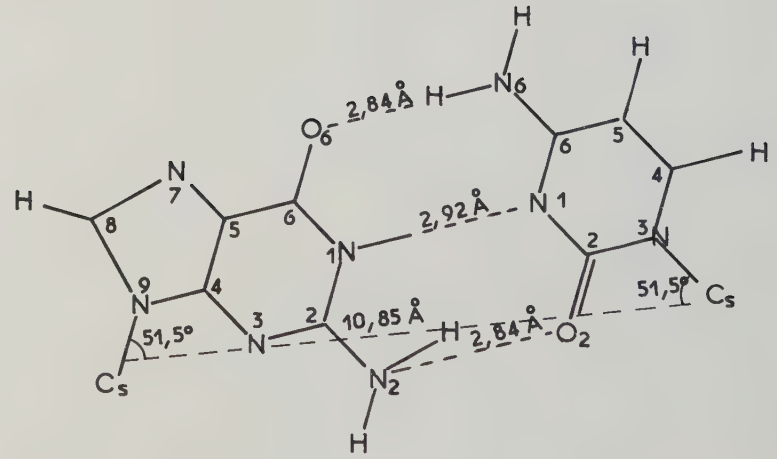


Fig. 2



Adénine - Thymine.



Guanine - Cytosine.

Fig. 3 - Paires de bases de Watson et Crick.

23) Méthodes d'étude de la structure

La méthode utilisée pour étudier la structure du DNA est la diffraction des RX. Par cette technique, furent étudiées des fibres orientées (2, 3, 4, 5), des solutions (6, 7) et la matière biologique proprement dite (têtes de spermatozoïdes) (8, 9, 10). D'autres méthodes telles que la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) (11), la microscopie électronique, ont confirmé les résultats des RX (6).

L'étude des fibres orientées concerne les sels de métaux alcalins du DNA. La conformation moléculaire dépend de l'ion présent et de l'humidité environnant la fibre (3).

Trois conformations ont été mises en évidence et nommées A, B et C. Elles sont hélicoïdales et possèdent les paires de bases spécifiques de WATSON et CRICK. Elles diffèrent par le pas de l'hélice, le nombre de nucléotides par tour d'hélice et la conformation des nucléotides (12) (tableau 1). Le modèle de WATSON et CRICK correspond à la conformation B.

Les données apportées par les clichés de RX n'étant pas suffisantes, on construit des modèles et on les ajuste afin d'obtenir le meilleur accord possible entre les diffractions calculées et les diffractions observées. Des modèles ont été construits pour les trois conformations A, B, C et affinés par WILKINS et ses collaborateurs (2, 3, 4, 5). En particulier, trois modèles successifs de la conformation B ont été envisagés (voir tableau II). L'étude par RMN du modèle 3 (11) a montré que le second moment calculé du phosphore : $1{,}90 \pm 0{,}04$ gauss^2 est en bon accord avec le moment expérimental : $1{,}91 \pm 0{,}05$ gauss^2.

Par contre, le modèle 1 est à exclure puisqu'il correspond à un second moment calculé valant 2,2 gauss^2. Les travaux de C. BROT et M. SZWARC ont donc confirmé nettement le modèle 3. L'étude des structures par diffraction n'est pas limitée aux solides. Grâce à la méthode de diffraction des RX aux petits angles mise au point par GUINIER, on a pu étudier la structure du DNA en solution. LUZZATI a, en effet, montré qu'en solution aqueuse, dans un domaine de concentration compris entre 1 et 50 %, les molécules sont en forme de batonnets de 20 Å de diamètre (6). D'autre part, par diffusion de la lumière, C. SADRON et ses collaborateurs (13) ont montré que la configuration du DNA peut être représentée par une chaîne en zig-zag. Chaque segment serait rectiligne et correspondrait à un batonnet en double hélice de WATSON et CRICK.

Il est important de savoir si ce qu'on observe "in vitro" n'est pas un artefact de préparation. Il ne semble pas que ce soit le cas, puisque les clichés de RX effectués "in vivo" sont assez bien définis pour montrer que le DNA a alors la conformation B (8, 9, 10).

- TABLEAU I -

Configuration	Nombre de nucléotides par tour d'hélice	Inclinaison des paires de bases dans la molécule	Sel	Humidité relative et conditions nécessaires	Réseau	Cristallinité	Dimensions de la maille a°_{A}	b°_{A}	c°_{A}	β°
A	11,0	20°	Na, K, Rb	75 %	Monoclinique	Cristalline	22,07	40,4	28,1	97,1
B	10	0°	Li	66 %	Orthorhombique	"	22,7	31,2	33,7	
			Li	75 % à 90 %	"	Semi-cristalline	24,4	38,5	33,6	
			Li, Na, K, Rb	92 %	Hexagonal	"	46		34,6	
B_2	9,9	0°	Na	75 % sous tension	Tétragonal	"	27,4		33,8	
C	9,3	- 5°	Li	44 %	Orthorhombique	"	20,1	31,9	30,9	
			Li	44 % dans certains échantillons seulement	Hexagonal	"	35,0		30,9	

TABLEAU II : coordonnées des modèles moléculaires du DNA pour la définition de r, Φ, Z, voir la réf (5). Le pas de l'hélice est à droite, il vaut 33,6 Å et il y a dix paires de nucléotides par tour.

Groupe	Atome	MODELE 1			MODELE 2			MODELE 3		
		r(A)	Φ°	Z(A)	r	Φ	Z	r	Φ	Z
Phosphate	P	9.58	54.9	-1.82	9.40	55	-1.35	9.05	58.8	-1.36
	O_1	8.85	62.7	-2.39	9.10	65	-1.63	8.88	62.9	0.04
	O_2	10.91	55.0	-2.49	10.80	54	-1.61	9.14	65.3	-2.45
	O_3	9.68	54.1	-0.27	9.00	53	0.00	10.33	54.2	-1.18
	O_4	8.95	46.2	-2.21	8.55	50	-2.30	7.85	52,3	-1.43
Sucre	C_1	6.30	60.1	0.00	6.05	64	0.15	5.72	71.5	0.31
	C_2	6.72	58.5	1.37	6.65	65	-1.18	6.95	74.1	-0.56
	C_3	7.73	67.0	-1.69	8.00	70	-0.99	8.13	71.1	0.35
	C_4	8.30	70.4	-0.35	8.20	70	0.50	7.58	70.4	1.80
	C_5	8.68	80.5	-0.27	9.10	78	1.05	8.08	79.1	2.63
	O_s	7.72	67.7	0.63	6.90	70	1.13	6.13	70.0	1.70
Purine	O_6	0.76	123.2	0.00	1.18	150	0.00	2.40	155.0	-0.14
	NH_2									
	C_6	1.44	66.0	0.00	1.33	86	0.03	1.70	124.0	-0.03
	C_5	2.84	71.8	0.00	2.70	82	0.07	2.90	104.0	0.02
	N_7	3.79	90.2	0.00	3.80	97	0.10	4.20	112.0	0.00
	C_8	4.93	81.5	0.00	4.87	87	0.13	4.95	98.0	0.10
	N_9	4.95	66.0	0.00	4.76	72	0.12	4.63	82.5	0.19
	C_4	3.83	56.3	0.00	3.57	63	0.09	3.30	79.0	0.16
	N_3	4.07	36.5	0.00	3.67	41	0.06	2.90	56.0	0.20
	C_2	3.20	20.8	0.00	2.73	24	0.02	1.70	40.0	0.14
	N_1	1.89	19.0	0.00	1.42	24	0.00	0.60	83.0	0.02
Guanine	$(NH_2)_2$	4.03	4.1	0.00	3.55	4	0.00	2.25	0.80	0.20
Pyrimidine	O_6	2.37	119.2	0.00	2.51	128	0.05	3.20	140.0	-0.14
	$(NH_2)_6$									
	C_6	2.92	93.0	0.00	2.87	102	0.08	3.20	117.0	-0.03
	N_1	2.60	64.5	0.00	2.35	73	0.06	2.40	96.0	0.05
	C_2	3.85	55.3	0.00	3.60	62	0.09	3.34	76.0	0.16
	O_2	4.35	39.0	0.00	3.98	43	0.07	3.40	55.0	0.23
	N_3	4.95	66.0	0.00	4.76	72	0.12	4.63	82.5	0.19
	C_4	5.07	82.0	0.00	5.11	88	0.13	5.17	97.0	0.10
	C_5	4.31	94.7	0.00	4.27	101	0.10	4.60	112.0	0.00
	CH_3	5.20	110.0	0.00	5.20	110	0.12	5.33	121.0	-0.09

La structure de WATSON et CRICK aussi appelée structure secondaire ou structure native est celle du DNA :

- en fibres dans une atmosphère à 92 % d'humidité pour le sel de Na, et 66 %, 75 à 90 % pour le sel de Li.

- dans les solutions aqueuses à température ambiante, pH voisin de la neutralité, force ionique supérieure à 10^{-3} ion g/l.

Si en solution, l'une de ces conditions n'est pas remplie, la structure ordonnée en double hélice est détruite et elle est remplacée par une configuration désordonnée. Un tel passage de l'ordre au désordre s'appelle la "dénaturation".

On vient de présenter la structure du DNA comme un édifice rigide. En fait, on ne peut l'observer que dans des conditions particulières, de nombreux facteurs pouvant la modifier "in vitro" comme nous allons le voir.

24) *Influence de la force ionique sur la stabilité du DNA.*

Le potentiel au voisinage du polyanion DNA est donné par la fonction

$$\psi(r) = f(r)\ e^{-Kr}$$

où K est le terme de Debye-Hückel tel que $K \sim \sqrt{\mu}$ où μ est la force ionique et r la distance à un anion de la chaîne du point où le potentiel est ψ.

Si l'on augmente la force ionique, $\psi(r)$ décroît très vite en fonction de r : ainsi, la répulsion entre deux anions phosphates voisins diminue lorsque la force ionique augmente.

Or, diminuer la répulsion entre les phosphates, c'est augmenter la stabilité de la double hélice : c'est ce qu'on constate expérimentalement par mesure de la température de fusion T_m (définition 4-1). Le point de fusion T_m est une fonction croissante de la force ionique du solvant (2-1).

On observe un tel phénomène avec les ions Na^+, Li^+, Ca^{++}, Mg^{++}, etc.

Certains ions divalents peuvent provoquer une hydrolyse locale.

Ce que nous venons de dire est relatif aux ions compensateurs, c'est-à-dire ceux qui neutralisent les charges $\gtrdot PO^-$: leur effet est purement électrostatique. Mais certains ions peuvent interagir différemment avec le DNA : alors il peut arriver que la courbe donnant le point de fusion en fonction du rapport $\frac{M^{++}}{DNA - P}$ passe par un maximum et soit, par conséquent une fonction décroissante de $\frac{M^{++}}{DNA - P}$ au-delà d'une valeur donnée de ce rapport (Ch. I - 21) (14).

- Chapitre I -

REGLE PHENOMENOLOGIQUE D'EVOLUTION DES SYSTEMES

1) *ENONCE* (15)

Soit un système quelconque, dans un état d'équilibre A caractérisé par les valeurs p_i', p_2', p_3', p_i' des variables intensives indépendantes p_1, p_2, p_3, p_i... (température, pression, fractions molaires etc). Par variation brusque[+] de la valeur de la variable p_1 qui passe de p_1' à p_i'', l'observateur écarte le système de son état d'équilibre initial A et déclenche ainsi son évolution vers un nouvel état d'équilibre B. On suit cette évolution en mesurant une certaine propriété P (paramètres cristallins, indice de réfraction, densité optique, susceptibilités électrique ou magnétique, etc) et on observe une loi d'évolution de la forme :

$$\alpha_P\ (t) = \varphi_P\ (k_{p_1} t,\ p_1'',\ p_2',\ p_3',\ p_i')$$

p_2', p_3', p_i' restant constants au cours de l'évolution.

- t est le temps mesuré à l'aide d'un système périodique (chronomètre par exemple) ;

- α_P est le degré d'évolution du système mesuré par la variation relative de la propriété P caractérisant le système dans les conditions fixées par les variables p_1, p_2, p_3...

+ "Brusque" signifie que la durée de variation de p_1' à p_1'' est négligeable devant le temps d'évolution du système.

$$\alpha_P = \left(\frac{P(t) - P(o)}{P(\infty) - P(o)} \right)_{p_1,\ p_2,\ p_3,\ p_i}$$

- La règle proposée est la suivante :

Le facteur k_{p_1} multiplicatif du paramètre temps t ne dépend que de la variable p_1 dont la variation brusque a déclenché l'évolution du système. On en tient compte en le notant k_{p_1}.

Il résulte de cette règle que si plusieurs variables indépendantes p_1, p_2, p_3... changent simultanément de valeur et deviennent p_1'', p_2'', p_3''... la loi d'évolution est de la forme :

$$\alpha_p(t) = \psi\ (t\ k_{p_1} \cdot k_{p_2} \cdot k_{p_3}\ ,\ p_1'',\ p_2'',\ p_3'',\ p_i')$$

ou

$$\alpha_p(t) = \psi\left(t \prod_j k_{p_j}\ ,\ p_1'',\ p_2'',\ p_3'',\ p_i'\right)$$

Remarque

Afin de voir si la règle est vérifiée, il est commode de porter $\alpha = \psi\ (\log t)$. La superposition de ces courbes par translation parallèle à l'axe des abscisses permet de déterminer l'amplitude $\log k_j$ de la translation.

Lorsqu'elle est vérifiée, cette règle montre que l'action des différents paramètres laisse la loi d'évolution inchangée. Elle souligne une variation globale de la vitesse d'évolution.

En effet, lorsqu'on fait varier, successivement, chacun des paramètres dénombrés, en leur donnant plusieurs valeurs possibles, on obtient un grand nombre de courbes $\alpha = \psi\ (t)$ différentes. Mais, l'application de la règle ramène par translation parallèle à l'axe des abscisses toutes ces courbes à une courbe unique représentant $\alpha = \psi\ (\log t)$.

Il apparaît ainsi qu'il est important de bien dénombrer les paramètres d'évolution d'un système afin de les maintenir constants en cours d'expérience. Lorsque ce contrôle expérimental peut être effectué de façon satisfaisante, une seule courbe d'évolution cinétique du système suffit pour l'établissement de sa loi générale d'évolution.

2) *CHOIX DE SYSTEMES*

Le système complexe susceptible d'évoluer que nous avons envisagé est le DNA mis en présence de certains ions qui sont capables de lui conférer des propriétés particulières.

L'évolution que nous avons suivie est une évolution structurale allant d'un état dénaturé vers un état renaturé (voir définitions II - 1). On caractérise souvent les solutions de DNA par leur point de fusion T_m (définition II - 4) : cette grandeur donne une indication sur leur stabilité.

Un travail général de G. L. EICHHORN et Y. A. SHIN (14) porte sur les possibilités de "renaturation" du DNA en présence de 7 ions divalents M^{++} (Mg^{++}, Co^{++}, Ni^{++}, Mn^{++}, Zn^{++}, Cd^{++}, Cu^{++}) et aussi sur la variation du point de fusion T_m en fonction du rapport $\frac{M^{++}}{DNA - P}$ (définition II - 4). Les résultats qu'ils ont obtenus et dont voici l'essentiel permettent de comprendre la manière dont furent choisis les systèmes étudiés.

21) *Justification à l'aide de la réf. (14) du choix du système*

211) Mg^{++} n'induit pas de "renaturation" du DNA si ce n'est un réarrangement partiel au hasard.

212) Co^{++}, Ni^{++}, Mn^{++}, Zn^{++}, moyennant des rapports convenables $\frac{M^{++}}{DNA - P}$ (mal précisé dans le travail des auteurs cités plus haut) peuvent induire une "renaturation" totale par simple refroidissement.

Si la "renaturation" est partielle après refroidissement, l'augmentation de la force ionique peut la rendre totale.

213) Cd^{++}, Cu^{++} : la "renaturation" n'est pas possible par simple refroidissement. Au contraire, l'effet hyperchromique est bloqué à sa valeur maximale.

L'augmentation de la force ionique déclenche la "renaturation" : celle-ci est totale à partir d'un certain seuil de force ionique.

Toutes ces conditions expérimentales égales, les "renaturations" sont beaucoup plus rapides en présence d'ions Cd^{++} qu'en présence d'ions Cu^{++}.

La figure 4 suivante, empruntée à G. L. EICHHORN et Y.A. SHIN représente $T_m = f\left(\frac{M^{++}}{DNA - P}\right)$ pour chacun des ions étudiés. Les cas extrêmes sont obtenus avec les ions Mg^{++} et Cu^{++}.

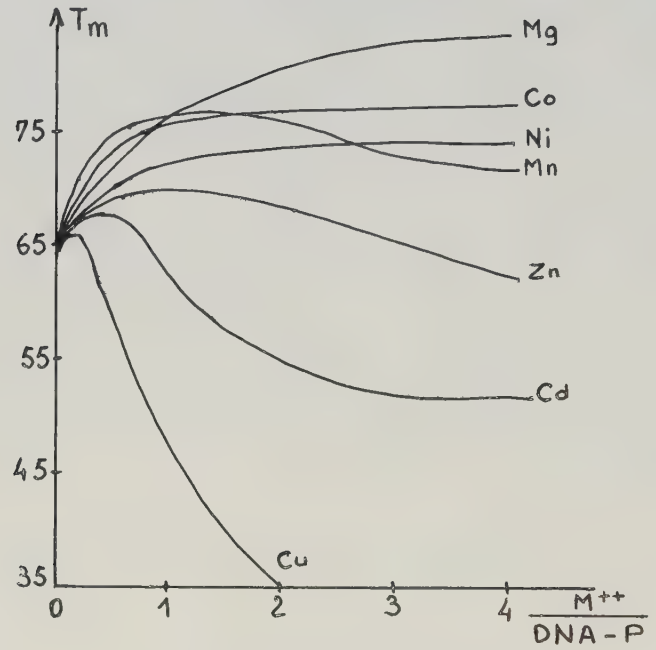


Fig. 4

Le premier conduit à une fonction $T_m = f(\frac{Mg^{++}}{DNA - P})$ croissante.

Le dernier donne une fonction $T_m = f\ (\frac{Cu^{++}}{DNA - P})$ croissante jusqu'à un maximum peu intense obtenu pour de très faibles concentrations en Cu^{++}, puis régulièrement décroissante. Les autres ions conduisent à des courbes intermédiaires entre les cas extrêmes, celles-ci étant disposées dans l'ordre où nous venons de citer les ions.

Seuls les ions Cd^{++} et Cu^{++} peuvent, lorsqu'ils sont ajoutés au DNA, abaisser le point de fusion jusqu'à une valeur inférieure à celle qu'il aurait en l'absence de ces ions.

Les systèmes cuivriques et zinciques choisis pour étudier les cinétiques de "renaturation" du DNA représentent ainsi chacun des deux types de systèmes utilisables pour "renaturer" le DNA de façon totale.

Du point de vue de la vérification, puis de l'utilisation de la règle que nous avons énoncée (I - 1), ces systèmes ont l'avantage de posséder un grand nombre de paramètres susceptibles de modifier leur évolution (voir dénombrement des paramètres au chapitre III). Les vitesses d'évolution n'excédant pas quelques

heures et étant au moins de l'ordre de la minute permettent l'observation du phénomène sans difficultés techniques particulières.

22) Définition des solutions cuivriques

Une étude bibliographique (16, 17, 18) a montré que la présence d'ions cuivriques confère aux solutions de DNA, en faible force ionique ($\sim 10^{-3}$ M), des propriétés particulières. Nous avons utilisé ces propriétés pour suivre un exemple d'évolution de la structure du DNA.

221) Résultats de travaux antérieurs

a) Après "dénaturation" thermique on n'observe pas de "renaturation" par refroidissement de la solution ; l'effet hyperchromique est le même à la température de "dénaturation" et après retour à la température ambiante.

b) La force ionique étant maintenue constante et faible, le point de fusion diminue lorsque le rapport $a = \frac{Cu^{++}}{DNA - P}$ augmente.

c) La "renaturation" de solutions dénaturées thermiquement est possible par augmentation de la force ionique.

d) Ces propriétés ne sont observables que si la quantité de Cu^{++} est suffisante. Par exemple, HIAI (16) note qu'à force ionique, concentration en DNA et température de "dénaturation" données, il faut une quantité de Cu^{++} minimale pour que l'effet hyperchromique maximal soit atteint.

222) Résultats de nos travaux

Après avoir confirmé les résultats des travaux antérieurs (fig. 5), nous avons précisé quelques points.

a) Le refroidissement des solutions dénaturées thermiquement est accompagné de "renaturation partielle" dès que le rapport $\frac{Cu^{++}}{DNA - P} < 0,5$.

b) Si l'on provoque la "renaturation" par augmentation de la force ionique (passage de $\mu' = 5.10^{-3}$ ion.g/l à $\mu = 0,12$ ion.g/l, par exemple) l'effet hyperchromique $h = \frac{d}{d_2}$ ne retourne à la valeur 1 que si le rapport $\frac{Cu^{++}}{DNA - P} \geq 2$ (fig. 6). En d'autres termes, la "renaturation" ne peut être totale qu'à partir d'un seuil.

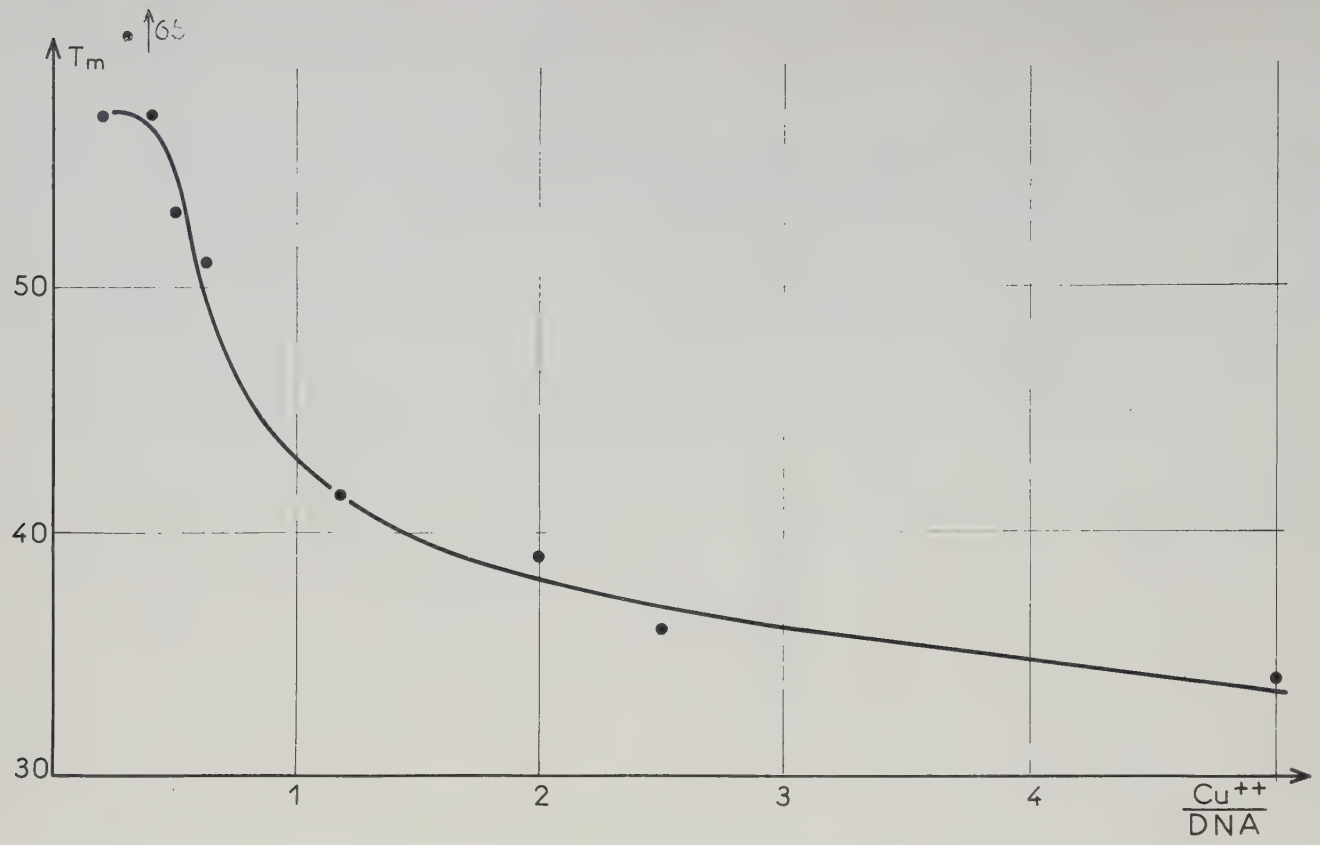

Tm
65
50
40
30
1
2
3
4
Cu++
DNA

Fig. 5

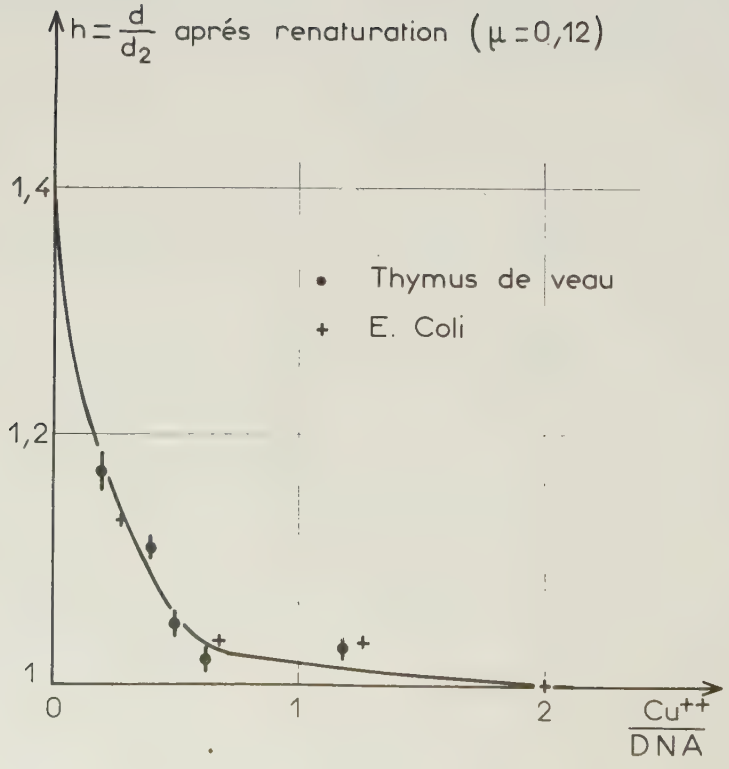

h = d/d2 aprés renaturation (μ = 0,12)
1,4
1,2
1
0
1
2
Cu++
DNA
Thymus de veau
E. Coli

Fig. 6

Ces constatations font apparaître deux directions de travail. L'une d'entre elles consiste en l'étude phénoménologique des cinétiques de "renaturation" des solutions cuivriques du DNA. L'autre direction est la recherche du rôle des ions Cu^{++} dans le processus précédent ; il s'agit alors d'élaborer un modèle définissant le mode de fixation des ions Cu^{++} sur le DNA.

23) *Définition des solutions zinciques*

Un travail de Y. A. SHIN et G. L. EICHHORN (19) a montré que la présence d'ions zinciques confère aux solutions de DNA de basse force ionique des propriétés particulières. Nous avons utilisé ces propriétés pour suivre un exemple d'évolution de la structure du DNA.

Rappels bibliographiques

Précisons la nature des propriétés particulières que les auteurs précédemment cités (19) ont pu mettre en évidence sur les solutions zinciques de DNA :

a) la température de fusion T_m des solutions zinciques de DNA est inférieure à la valeur qu'elle aurait en présence d'ions tels que des ions Ca^{++}, par exemple, la force ionique du milieu étant la même ($\mu = 5.10^{-3}$ ion.g/l).

La T_m est une fonction croissante du rapport $b = \frac{Zn^{++}}{DNA - P}$ jusqu'à un maximum obtenu pour $b \sim 1$, puis décroît en restant néanmoins supérieure à la valeur qu'elle aurait en l'absence de l'ion Zn^{++}.

b) Le refroidissement de solutions zinciques dénaturées thermiquement déclenche une "renaturation" totale de DNA de toutes origines. En particulier, du DNA tel que celui qu'on extrait du thymus de veau peut être "renaturé" totalement par cette méthode.

c) En réalité, la "renaturation" ne peut être totale que si $b = \frac{Zn^{++}}{DNA - P} \geq 4$ (19)+

+ Nos expériences n'ont conduit à une "renaturation" totale que pour $b \geq 8$.

- Chapitre II -

METHODES D'ETUDE DES CHANGEMENTS DE STRUCTURE DU DNA

1) *DEFINITIONS*

11) *Le DNA natif* a la structure décrite par WATSON, CRICK et WILKINS ; deux chaînes de polynucléotides sont enroulées en double hélice, les paires de bases étant empilées parallèlement les unes aux autres.

12) *Le DNA dénaturé* : le DNA dénaturé a perdu la structure compacte et ordonnée qu'il avait à l'état natif. La structure de l'état dénaturé ne peut pas être définie avec précision parce qu'elle est le fruit du hasard. En effet, si la séparation des brins n'est pas totale, des boucles peuvent se former, des appariements de bases appartenant à un même brin sont susceptibles de se produire au sein d'une boucle, etc.

13) *La "dénaturation"* est le passage de l'état natif ordonné à "l'état dénaturé" désordonné. Plus simplement, c'est une transition ordre → désordre.

14) *La "renaturation"* est le processus inverse de la "dénaturation", c'est-à-dire une transition désordre → ordre.

2) *AGENTS DENATURANTS* (20, 21, 22, 23)

La double hélice de DNA est un édifice dont la stabilité résulte de l'antagonisme entre deux types d'énergie : d'une part l'énergie d'attraction entre les bases (stacking), d'autre part la répulsion électrostatique entre les phosphates.

Dénaturer le DNA, c'est détruire l'équilibre énergétique en modifiant l'une ou l'autre énergie. D'où deux types d'agents dénaturants :

21) *Agents dénaturant par destruction du stacking*

- Elévation de température
- Action du méthanol, du formamide, des anions fortement polarisables

22) *Agents modifiant l'énergie électrostatique*

- Solvants de pH < 5 et pH > 9 : ils modifient l'état de protonation des bases.
- Solvants de force ionique < 10^{-3} ion.g/l. Il faut cependant noter que cette force ionique limite est fonction de la concentration en DNA. En effet, si la solution est très concentrée en DNA, les ions Na^+ du DNA préparé sous forme de sel suffisent pour maintenir la structure de WATSON et CRICK.

3) *AGENTS RENATURANTS*

31) En l'absence de certains ions tels que les ions Cu^{++} ou Zn^{++}, seuls des DNA homogènes peuvent être renaturés : l'agent renaturant le plus utilisé est un abaissement de la température après "dénaturation" thermique. On ne sait pas "renaturer" du DNA de thymus de veau, par exemple, par cette méthode.

32) En présence d'ions Cu^{++} ou Zn^{++} tous les DNA peuvent être renaturés complètement (14, 16, 17, 18, 19). L'agent "renaturant" dépend de l'ion envisagé.

321) En présence d'ions Zn^{++} : l'abaissement de la température à une température inférieure au point de fusion suffit pour que la "renaturation" puisse se faire complètement (14, 19).

322) En présence d'ions Cu^{++} : l'abaissement de température après "dénaturation" thermique voit l'état "dénaturé" se maintenir. Seule une augmentation de la force ionique du milieu permet de déclencher la "renaturation" de solutions cuivriques de DNA (14, 16, 17).

4) *TECHNIQUES D'ETUDE DU DNA*

Les méthodes les plus courantes d'étude du DNA peuvent être classées en deux groupes : d'une part, les méthodes donnant des indications sur la structure globale de la macromolécule, d'autre part, les méthodes renseignant sur sa structure locale.

Parmi le premier type de méthodes, on peut citer : la viscosimétrie, la centrifugation, la diffusion de la lumière, la diffraction des rayons X aux petits angles, la microscopie électronique.

Afin d'étudier la structure locale du DNA, on peut utiliser : la spectrophotométrie U.V., la Dispersion Optique Rotatoire (D.O.R.) ou le Dichroïsme Circulaire (D.C.).

Les processus de "renaturation" de DNA en solution que nous nous proposons d'étudier nécessitent l'emploi d'une technique précise, sensible et de lecture rapide par rapport à la durée du processus.

Un examen des différentes techniques a montré que les plus intéressantes, du point de vue que nous venons d'exposer, sont :

- La spectrophotométrie U.V.
- La D.O.R.
- Le D.C.

Nous verrons (Ch. V, fig. 75, 79, 80) que si les deux dernières techniques permettent bien de caractériser le DNA à l'état natif, dénaturé et renaturé, elles sont peu précises lorsqu'il s'agit de suivre une évolution.

41) *Spectrophotométrie U.V.*

N'ayant, à des fins cinétiques, utilisé que la spectrophotométrie U.V., nous n'avons défini le degré d'évolution α d'une "renaturation" du DNA que dans le cadre de cette technique.

411) Définition du degré d'évolution

Le maximum d'absorption du DNA est à la longueur d'onde $\lambda = 2600$ Å. Le coefficient d'extinction moléculaire ε_P, ramené à un atome de phosphore et mesuré à cette longueur d'onde, dépend de la structure du DNA.

(ε_P) DNA natif		(ε_P) DNA dénaturé		(ε_P) nucléotides
6300	$<$	8800	$<$	9000
(I)		(II)		(III)

L'inégalité (I) $<$ (III) traduit l'hypochromicité du DNA en double hélice. Cette propriété est une conséquence de l'interaction entre les bases empilées parallèlement les unes aux autres.

La grandeur physique directement mesurable est la densité optique d_{2600} telle que :

$$d_{2600} = \frac{\varepsilon_P \cdot c \cdot 9,28 \cdot 1}{31 \cdot 10^2}$$

où c est la concentration du DNA en grammes/litre
l est la longueur de la cellule de mesure
31 est la masse atomique du phosphore
9,28 % est le taux de phosphore dans le DNA

Remarque

Le DNA en fibres contient 10 à 15 % d'humidité et d'électrolytes venant de la préparation. Par conséquent, il est préférable de calculer c à partir de d_{2600} connaissant ε_P.

Pour simplifier les notations, nous écrirons :

(ε_P) DNA natif $= \varepsilon_2$ la densité optique $d_2 = \varepsilon_2 \, c_o \, l$

(ε_P) DNA dénaturé $= \varepsilon_1$ la densité optique $d_1 = \varepsilon_1 \, c_o \, l$

où c_o est la concentration du DNA exprimée en atome P/l (DNA - P).

On exprime souvent la concentration des solutions de DNA en unité de densité optique qu'on note D.O. :

Une unité D.O. correspond à $1,5.10^{-4}$ DNA - P.

Considérons un état intermédiaire entre les deux états définis précédemment. Soient c_1 et c_2 les concentrations en DNA dénaturé et natif, c_1 et c_2 sont liées par la relation :

$$c_1 + c_2 = c_o$$

Si nous supposons que l'interaction entre brins dénaturés et brins natifs est négligeable, la densité optique correspondant à cet état est :

$$d = (\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2)\, l$$

On peut en tirer :

$$c_2 = \frac{d_1 - d}{d_1 - d_2} \quad c_o$$

On fait apparaître ainsi la fraction de DNA en double hélice :

$$\frac{c_2}{c_o} = \alpha = \frac{d_1 - d}{d_1 - d_2} \qquad o \leqslant \alpha \leqslant 1$$

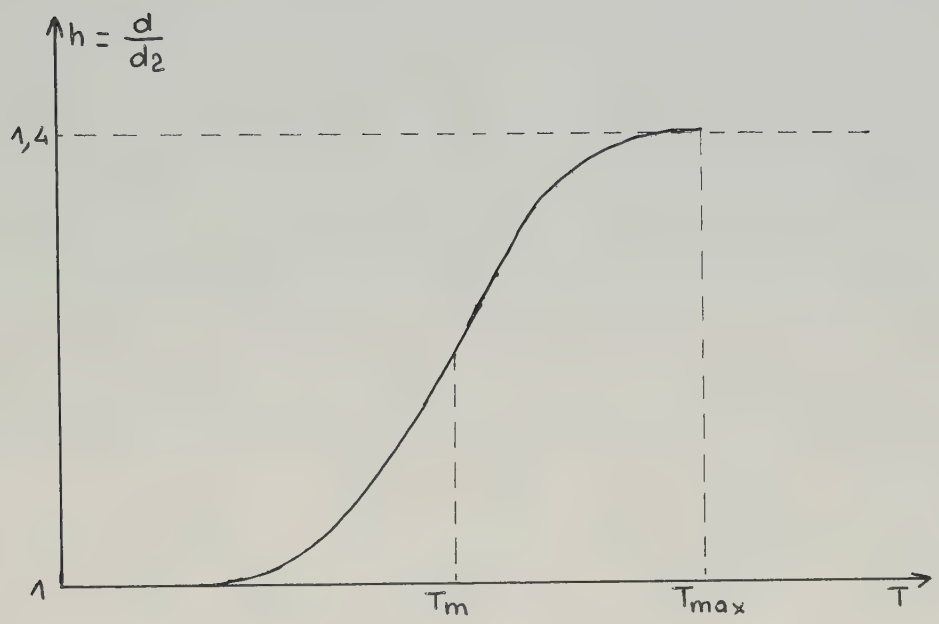
On définit l'effet hyperchromique h par le rapport :

$$h = \frac{d}{d_2}$$

Souvent on définit l'hypochromicité par l'expression :

$$H = 1 - \frac{d_{polymère}}{d_{monomère}}$$

Si l'agent dénaturant est la température, la courbe h = f(T) est appelée "courbe de fusion".



Le "point de fusion" T_m est défini par la relation :

$$d = \frac{d_2 - d_1}{2} \quad (22, 24, 25)$$

$$\alpha = 0,5$$

A la température T_{max}

$h \sim 1,4$ quelle que soit la source du DNA

$\alpha = 0$

412) Spectrophotométrie Différentielle (S.D.)

Cette technique permet de rendre compte de la complexation d'une substance avec un chromophore : une telle complexation induit, en effet, une modification de la forme du spectre de celui-ci.

Afin d'utiliser la S.D. pour l'étude des complexes DNA V309 -Cu^{++} ou Zn^{++}, nous avons dissous ce DNA à la concentration de 3.10^{-4} DNA - P/l dans une solution de $Na_2 SO_4$.

Le spectrophotomètre utilisé est un appareil à double faisceau type Cary 15. Le protocole expérimental est le suivant :

On place dans les voies de mesure et de référence la solution de DNA à étudier. Puis, on ajoute à l'aide d'une microseringue une solution concentrée d'ion à étudier dans la voie de mesure et, afin de compenser la variation de concentration, la même quantité d'eau dans la voie de référence. Le spectre différentiel enregistré dans ces conditions rend compte de la fixation éventuelle de l'ion sur le DNA.

42) *Dispersion Optique Rotatoire (D.O.R.) et Dichroïsme Circulaire (D.C.)*

Afin de définir les phénomènes de D.O.R. et de D.C., il est nécessaire de rappeler quelques notions de polarisation rotatoire.

On appelle milieu optiquement actif un milieu capable de faire tourner d'un angle α le plan de polarisation d'une lumière incidente rectiligne.

Si, avec FRESNEL, nous remarquons que deux vibrations - les vibrations circulaires droite et gauche - sont transmises sans altération, on peut attribuer le pouvoir rotatoire à une différence entre les vitesses de propagation de ces deux vibrations. La traversée d'une épaisseur l de milieu optiquement actif introduit entre les vibrations circulaires droite et gauche une différence de marche $\delta = (n'' - n')l$, d'où une différence de phase

$$\psi = \frac{2\pi (n'' - n')l}{\lambda}$$

En décomposant une vibration rectiligne d'amplitude a en deux vibrations circulaires inverses d'amplitude $\frac{a}{2}$, on montre aisément qu'une telle différence de phase fait tourner le plan de la vibration rectiligne d'un angle $\alpha' = \frac{\psi}{2}$

$$\alpha' = \frac{\pi (n'' - n')l}{\lambda}$$

On définit une grandeur appelée pouvoir rotatoire spécifique :

$$\{\alpha'\} = \frac{\alpha'}{l\rho}$$

L'épaisseur de substance traversée l est exprimée en dm.
ρ est la masse volumique de la substance exprimée en g/cm^3.

Si la substance douée de pouvoir rotatoire est en solution dans un solvant non actif à la concentration c exprimée en gramme pour 100 cm^3 de solution, le pouvoir spécifique est :

$$\{\alpha'\} = \frac{\alpha' \times 100}{lc}$$

On peut aussi définir un pouvoir rotatoire molaire

$$\Phi = \{\alpha'\} \times \frac{M}{100}$$

Le pouvoir rotatoire dépend de la longueur d'onde incidente λ : c'est le phénomène de dispersion optique rotatoire : la formule théorique de Drude donne la rotation en fonction de la longueur d'onde λ située dans la région de transparence de la substance étudiée :

$$\alpha' = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$$

où A est une constante, et λ_o la longueur d'onde du maximum des bandes d'absorption.

Remarque : la formule précédente n'est plus valable lorsque λ est voisine de λ_o ; α' présente une dispersion anormale. On donne à l'allure de cette dispersion anormale le nom d'effet COTTON, et on le caractérise souvent par la longueur d'onde de ses extremums, de son centre de symétrie et par son amplitude. La théorie conduit dans ce cas à :

$$\alpha' = \frac{A(\lambda^2 - \lambda_o^2)}{(\lambda^2 - \lambda_o^2) + \Gamma^2 \lambda^2 \lambda_o^2}$$

Où Γ est un coefficient apparaissant dans l'expression théorique de la constante diélectrique complexe.

Ainsi, la dispersion rotatoire est directement liée à l'existence et à la position des bandes d'absorption. Il en est de même pour le dichroïsme circulaire : en effet, si le milieu actif est absorbant, les deux vibrations circulaires de sens inverses qui s'y propagent avec des vitesses différentes peuvent également y subir des absorptions différentes. La lumière rectiligne incidente est, après traversée du milieu étudié, transformée en une vibration elliptique, l'angle

du grand axe de l'ellipse avec la direction incidente étant, comme dans le cas précédent :

$$\alpha' = \frac{\pi\,(n'' - n')l}{\lambda}$$

On démontre que l'ellipticité

$$\psi = \frac{\pi(\varepsilon'' - \varepsilon')l}{\lambda}$$

où ε'' et ε' sont les coefficients d'extinction du milieu pour les deux vibrations circulaires composantes de la lumière rectiligne incidente.

Ayant montré que les phénomènes de D.C. et de D.O.R. sont liés notamment à l'activité optique du milieu, précisons, à l'échelle moléculaire, ce qui caractérise une substance optiquement active :

Le pouvoir rotatoire est dû à l'existence d'une dissymétrie moléculaire provenant soit :

- d'une différence de polarisabilité des groupes attachés à l'atome asymétrique
- d'une dissymétrie de la polarisabilité due à des arrangements spatiaux des groupes dans la molécule.

L'interprétation théorique du pouvoir rotatoire a fait l'objet de nombreux travaux analysant les interactions rayonnement - matière (28) (26) (voir bibliographie de la réf. 26).

L'exploitation de ces théories dans le cas particulier qui nous intéresse, paraît difficile.

Etude du DNA par D.O.R. et D.C.

L'interprétation du D.C. n'est possible que si l'on possède assez d'informations sur la nature, l'intensité et la polarisation des transitions du chromophore isolé et sur l'identification des bandes d'absorption du polymère.

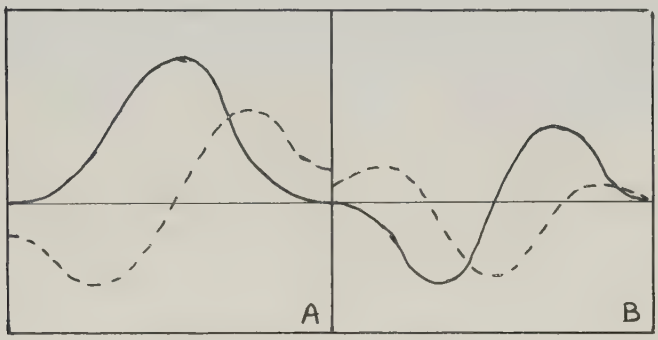
L'activité optique des polymères structurés a été étudiée d'un point de vue théorique par TINOCO (27). Deux types d'interactions peuvent conduire à un nouvel effet COTTON dans un système de chromophores disposés de façon ordonnée :

1) l'interaction entre moments de transition identiques c'est-à-dire l'interaction excitonique. TINOCO montre que ceci conduit à une conservation de la force rotatoire totale donnant un effet COTTON positif et négatif de part et d'autre de la bande d'absorption.

2) l'interaction entre des moments de transition différents. Dans ce cas le dipôle de transition d'une transition donnée interagit avec les polarisabilités principales des bases voisines.

L'amplitude de ces deux types d'interaction dépend de l'énergie des différents moments de transition et ainsi de la géométrie de la structure.

TINOCO illustre ceci par la figure suivante :



—— Dichroïsme circulaire
--- Dispersion optique rotatoire
} d'un système de chromophores en interaction

A - Interaction de dispersion
B - Interaction excitonnique

Si on introduit dans les solutions de DNA des ions susceptibles de se fixer sur les bases, on peut s'attendre à une modification de la géométrie de la molécule qui sera éventuellement accompagnée d'une modification de la position du maximum et de l'intensité des bandes d'absorption du DNA.

Si la théorie de la D.O.R. et du D.C. du DNA seul est connue, il n'en est pas de même pour l'attribution des spectres du DNA en présence d'ions métalliques.[+] L'interprétation des résultats obtenus en présence de différents ions ne peut être que qualitative. Il est commode de choisir pour courbe de référence la courbe de D.O.R. du DNA seul : nous admettrons qu'elle est caractéristique d'une conformation donnée. Nous comparerons les autres courbes de D.O.R. à la courbe de référence et nous verrons si la présence d'ions modifie beaucoup la conformation du DNA par rapport à celle-ci.

Ces techniques ont été utilisées pour l'étude des complexes DNA de thymus de veau (V 309) avec les ions Cu^{++} et Zn^{++}. Pour ce faire, le DNA V 309 est mis en solution à la concentration de $1,5.10^{-4}$ DNA.P/l environ dans $Na_2 SO_4$ à différentes forces ioniques μ (voir chapitre V-3). Les ions Cu^{++} ou Zn^{++} sont ensuite ajoutés à l'aide d'une solution de 3.10^{-2} M de $Cu SO_4$ ou $Zn SO_4$, afin d'ajuster les rapports a ou b (Ch. III.51) aux valeurs convenables. Toutes les mesures ont été faites avec une cellule de longueur 1 cm, la D.O.R. étant effectuée à l'aide d'un spectro-polarimètre FICA et le D.C. à l'aide d'un dichrographe 2 JOUAN.

[+] Cette question a été traitée de façon complète par F. KLOTZ (28).

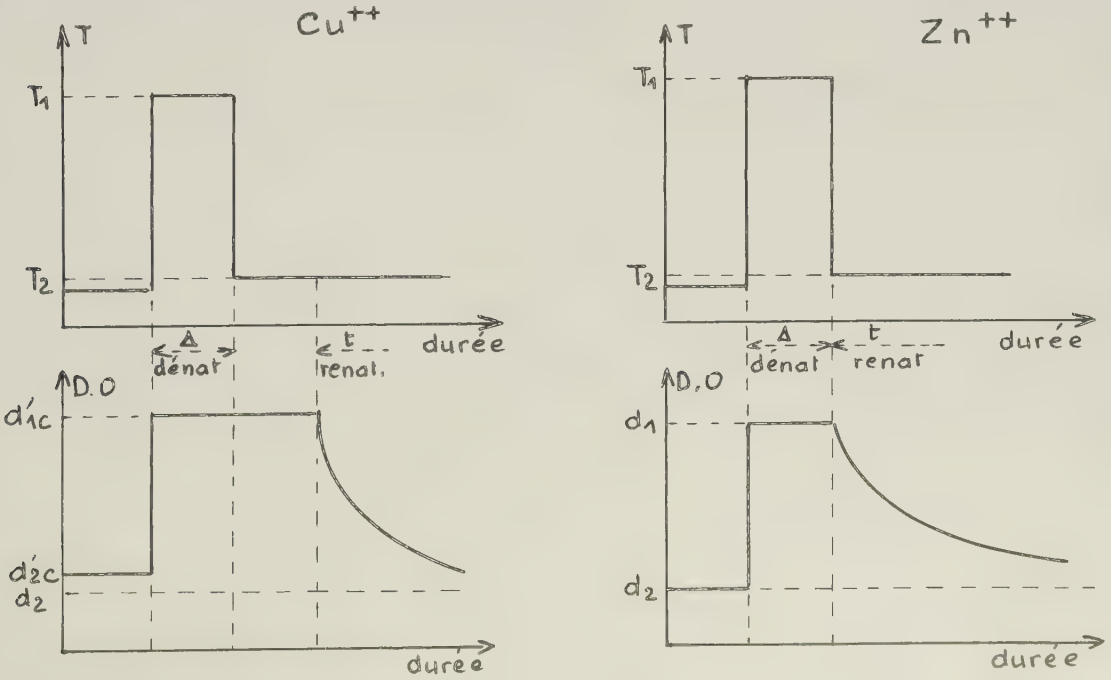
5) *TECHNIQUES DE "DENATURATION" ET "RENATURATION" DE SOLUTIONS CUIVRIQUES ET ZINCIQUES DE DNA*

Les agents "renaturants" des solutions cuivriques et zinciques de DNA étant distincts, les techniques de "dénaturation" et "renaturation" de ces solutions sont légèrement différentes (Ch. I - 22, 23).

Dans les deux cas, il faut chauffer les solutions de DNA contenant une quantité connue d'ions Cu^{++} ou Zn^{++} dans un solvant de force ionique μ' à une température T_1 pendant un temps Δ, puis refroidir la solution aussi rapidement que possible à la température T_2 choisie pour étudier la cinétique de "renaturation". A cette température, dans le cas des solutions cuivriques, la solution est maintenue à la température T_2 pendant une durée θ allant de la fin de la "dénaturation" jusqu'au début de la "renaturation" déclenchée par une augmentation de la force ionique μ. Au contraire, les solutions zinciques se renaturent spontanément au cours du refroidissement dès que la température T_2 est atteinte, d'où la nécessité d'un refroidissement très rapide pour définir une "renaturation" isotherme.

Quelle que soit la nature de la solution étudiée, on suit le processus de "renaturation" par spectrophotométrie U.V.. Le réarrangement des bases conduisant à une structure ordonnée, s'accompagne d'une diminution de densité optique D.O., celle-ci passant de la valeur initiale d_1 à la valeur finale d_2 au cours du temps t.

Les schémas suivants résument la nature des traitements appliqués aux solutions cuivriques et zinciques de DNA :



Une partie du travail expérimental a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre type Cary 14 RI, puis cet appareil a été remplacé par un Cary 16 dont les performances sont meilleures notamment du point de vue de l'évaluation des densités optiques.

Nous décrirons le matériel et les méthodes utilisés avec le Cary 14 RI dans le cas des solutions cuivriques puis zinciques. Ensuite, nous indiquerons dans un tableau comparatif le petit nombre de modifications expérimentales accompagnant l'emploi du Cary 16 ainsi que les précisions respectives des mesures faites avec les deux types de spectrophotomètres.

Les traitements expérimentaux des solutions cuivriques et zinciques ne diffèrent que par les méthodes de "dénaturation" et "renaturation". La nature des solutions de DNA et l'enregistrement des courbes cinétiques d = f(t) sont identiques.

51) *Nature des solutions de DNA*

Ce travail a été effectué sur des échantillons de DNA de thymus de veau, de E. Coli, de H. Influenzae.[+]

Les solutions de DNA étudiées sont préparées à partir d'une même solution-mère concentrée et elles contiennent :

4 à $4{,}5.10^{-5}$ DNA - P/l (quantité de DNA exprimée en atome-g de phosphore par litre)

$1{,}67.10^{-3}$ M $Na_2 SO_4$ donnant une force ionique $\mu' = 5.10^{-3}$ ion g/l.

($\mu' = \sum \frac{1}{2} c_i z_i^2$, c_i étant la concentration des ions exprimée en ion g/l, et z_i leur charge).

des quantités variables de $Cu SO_4$ ou $Zn SO_4$, les rapports $\frac{Cu^{++}}{DNA - P}$ et $\frac{Zn^{++}}{DNA - P}$ étant appelés "a" et "b".

[+] Nous remercions Messieurs DAUNE et POUYET respectivement professeur et maître de recherches au Centre de Recherches sur les Macromolécules ; ils ont eu l'amabilité de nous fournir les DNA utilisés.

52) *Appareils*

521) Spectroscopie

Les diminutions de densité optique au cours des "renaturations" ont été enregistrées à la longueur d'onde λ = 260 nm. Le tableau (III) indique les précisions respectives des spectrophotomètres utilisés.

On sait que la "dénaturation" de solutions cuivriques ou zinciques de DNA s'accompagne d'un déplacement du maximum d'absorption de 3 à 5 nm vers les grandes longueurs d'onde. La valeur de la longueur d'onde choisie λ = 260 nm est intermédiaire entre les longueurs d'onde des maximums d'absorption des DNA natif et "dénaturé". Le choix de cette valeur de λ n'introduit pas d'erreur appréciable sur la détermination de d = f(t).

522) Thermostatation

Le dispositif de thermostatation des solutions à la température T_2 de "renaturation" est constitué dans le Cary 14 par une cellule en silice à double paroi (fig. 7) et un ultra-thermostat à circulation.

Pour des raisons d'ordre purement technique, cette cellule ne peut pas être adaptée au Cary 16 et on a utilisé dans ce cas une cellule parallélépipédique "Hellma" de longueur 1 cm. La thermostatation est alors faite par circulation d'un liquide de thermostatation dans une jacquette extérieure à la cellule.

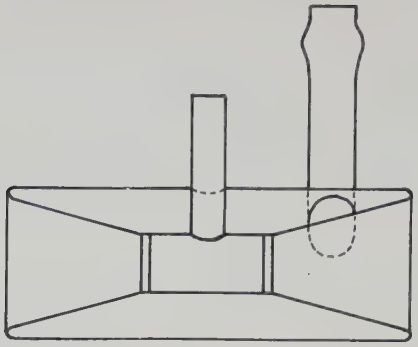
523) Mesure des variations de température

L'emploi d'un thermo-couple en chromel-alumel relié à un millivoltmètre enregistreur "Graphispot" SEFRAM a montré que :

Les écarts de température entre différents points de la cellule sont au plus de 0,06° C.

La température en un point donné de la cellule varie de moins de $\pm$ 0,05° C au cours du temps.

Coupe AA



Vue de dessus

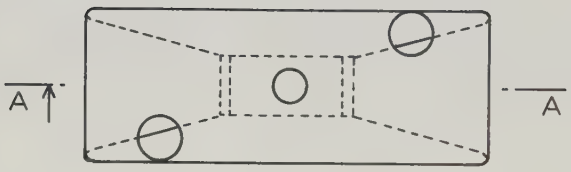


Fig. 7

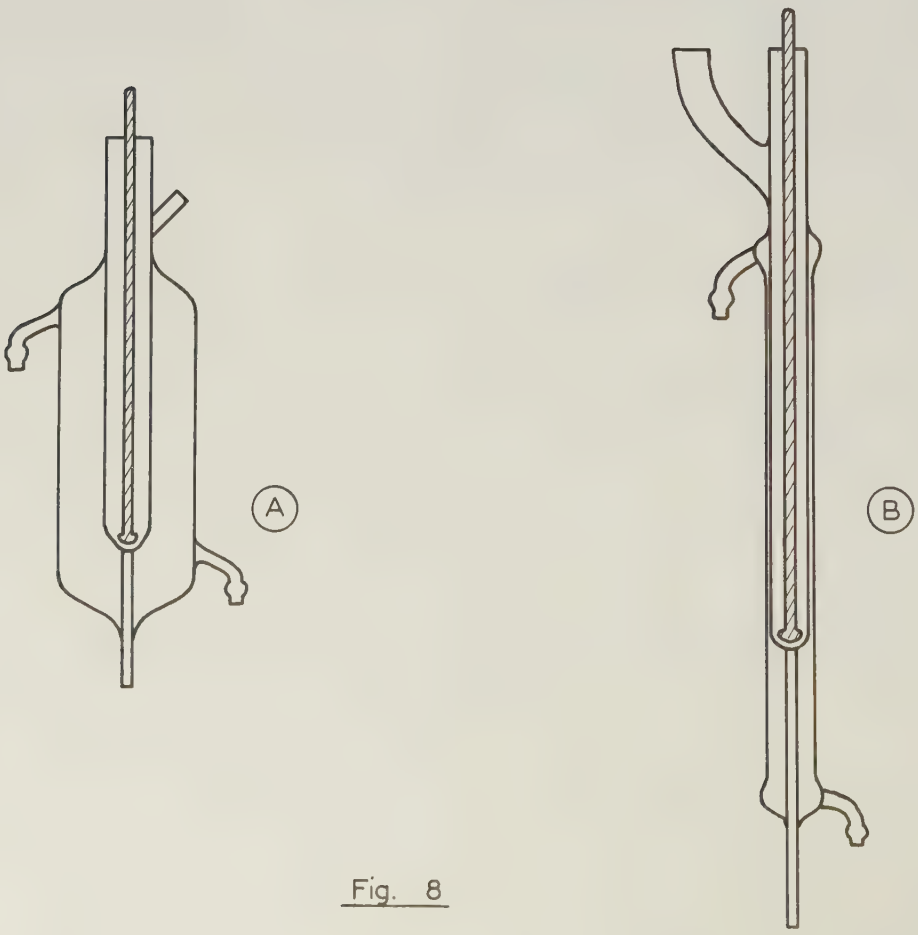


Fig. 8

53) Traitement "dénaturant" des solutions cuivriques

Les cellules de mesures utilisées dans les Cary 14 et 16 diffèrent non seulement par la forme et les méthodes de thermostatation, mais aussi par leur contenance. Ainsi les quantités de liquide chauffées à la température T_1 sont respectivement n = 10 cm^3 et n = 4 cm^3. La durée du refroidissement de T_1 à T_2 est de 1 min. environ. Le temps nécessaire pour porter la solution à T_1 dépend de n et de T_1.

54) "Renaturation" des solutions cuivriques

541) Mode opératoire

v cm^3 de solution de $Na_2 SO_4$ sont placés dans la cellule de mesure. Cette quantité de l'ordre de 0,1 cm^3 est mesurée avec une microseringue "Agla" avec laquelle on peut apprécier 0,0001 cm^3.

Lorsque la cellule est placée dans le compartiment de mesure et thermostatée à T_2, V cm^3 de solution de DNA à renaturer sont mélangés aux v cm^3 de solution saline.

L'avantage de la cellule cylindrique (fig. 7) est de faciliter la formation d'un tourbillon pendant l'injection du DNA. Cette agitation suffit pour effectuer un bon mélange des deux solutions : ainsi la durée du mélange est celle de l'injection, soit environ 5 secondes. Le volume V ajouté est de l'ordre de 4 cm^3 ; l'injection est faite à l'aide d'une seringue médicale ordinaire de contenance 5 cm^3 avec laquelle on peut apprécier environ 0,05 cm^3.

La même méthode d'injection utilisée avec la cellule "Hellma" ne suffit pas pour bien mélanger les solutions de $Na_2 SO_4$ et de DNA : il faut alors agiter la cellule avant de commencer l'enregistrement d = f(t) et ceci dure 10 s. Le volume V de DNA est de 2 cm^3 mesurés à l'aide d'une seringue médicale de 2 cm^3 : l'erreur de lecture n'excède pas 0,025 cm^3.

Lorsque le mélange des volumes v de $Na_2 SO_4$ et V de DNA est terminé, l'enregistrement des courbes d = f(t) est commencé. Mais les courbes d = f(t) ne peuvent pas être enregistrées dans leur totalité parce que le temps de réponse de l'appareil et les bulles apparaissant au moment du mélange empêchent ou perturbent l'enregistrement de la courbe. Ainsi d_1 ne peut pas être lu sur la courbe d = f(t). Nous verrons au Ch. III - 3 comment on peut déterminer d_1 à partir de la valeur $d_{2\ lim}$ lue en fin de "renaturation".

542) Choix de l'agent "renaturant"

Nous avons utilisé $Na_2 SO_4$ parce que l'ion SO_4^{--} n'absorbe pas au voisinage de la longueur d'onde $\lambda = 260$ nm. Ainsi, la détermination de $(d_2)_{lim}$ comparée à d_2 évaluée sans "renaturation" n'est pas entachée d'une erreur due à une absorption parasite.

Citons deux sels de sodium responsables d'une absorption parasite au cours des renaturations : $Na NO_3$ et Na Cl.

L'ion NO_3^- est caractérisé par une bande d'absorption à $\lambda = 300$ nm. Cette bande est assez large pour s'étendre jusqu'à $\lambda = 260$ nm. Il serait possible d'annuler la densité optique $d_{NO_3^-}$ gênante en prenant pour liquide de référence une solution de $Na NO_3$ à une concentration égale à sa concentration dans la solution de DNA en cours de "renaturation". Mais une telle manipulation introduirait une cause d'erreur supplémentaire, à savoir, des différences inévitables entre les concentrations des solutions de mesure et de référence.

Pour les mêmes raisons, nous avons renoncé à l'utilisation de Na Cl, ce sel donnant avec l'ion cuivrique Cu^{++} un complexe dont la bande d'absorption est à 250 nm. L'étude systématique de ce complexe serait, certes, intéressante, mais elle n'est pas indispensable pour la poursuite de nos travaux. Aussi, nous nous sommes limités à la mise en évidence qualitative du phénomène afin de montrer que le choix de l'agent renaturant n'a pas été fait au hasard mais dans le but de faire des mesures aussi précises et reproductibles que possible.

55) Dispositifs de "dénaturation" et trempe des solutions zinciques (fig. 8)

551) "Dénaturation"

Elle est obtenue en chauffant la solution à la température $T_1 = 80°$ C pendant le temps Δ.

La portion A du dispositif (fig. 8) a pour but :

- de porter et de maintenir l'ensemble de la solution à la température T_1,
- de permettre le passage rapide de la solution de la portion A vers la portion B.

La portion A est une pièce de verre à double paroi reliée à un thermostat à circulation.

A la partie inférieure, le système de fermeture (un rodage sphérique) est situé à l'intérieur de l'enveloppe de thermostatation. Un tel système limite

les écarts de température entre différents points de la solution à 0,06° C. La température de "dénaturation" (T_1 = 80° C) est atteinte en 3 min lorsqu'on traite n = 6 cm^3 de solution.

La "dénaturation" ayant été réalisée à température aussi homogène que possible, il faut refroidir rapidement la solution jusqu'à la température T_2.

552) Trempe

L'ouverture du rodage sphérique de A libère rapidement le liquide : celui-ci arrive dans B thermostaté à la température T_2.

B est un réfrigérant de West dont l'enveloppe de thermostatation est très mince permettant ainsi un renouvellement du liquide de thermostatation extrêmement rapide. Un rodage sphérique permet, comme dans A, de maintenir la totalité du liquide à l'intérieur de l'enveloppe de thermostatation.

La température T_2 est atteinte au bout de 1 min 15 s. A partir de ce moment-là, la "renaturation" est effectuée de façon isotherme.

56) "Renaturation" des solutions zinciques

La "renaturation" commence dès que la solution cesse d'être à la température T_1. Mais la portion non isotherme de la "renaturation" ne nous intéresse pas puisque nous souhaitons étudier une transformation dont les paramètres, et en particulier la température T_2, sont maintenus constants. C'est la raison pour laquelle nous attendons que la température T_2 soit atteinte pour vider le contenu de B dans une seringue et l'injecter dans la cellule de mesure thermostatée à la température T_2. Dès que l'injection est terminée, l'enregistrement d = f(t) commence. L'injection durant 10 s, toutes les courbes expérimentales d = f(t) que nous obtenons ne commencent qu'au temps t = 1 min 25 s [+].

[+] Ceci impose une limitation des conditions expérimentales : on ne peut, en effet, étudier que les "renaturations" donnant $\alpha \leqslant 0,75$ au temps t = 1 min 25 s.

57) *Dosage des ions Cu^{++} au cours de la "renaturation" du DNA*

Si l'on souhaite doser les ions Cu^{++} libres au cours de la "renaturation" du DNA, il faut utiliser une méthode sensible, capable de doser les ions Cu^{++} de façon continue sans nécessiter une préparation particulière de la solution (dégazage par exemple) et sans détruire le système étudié.

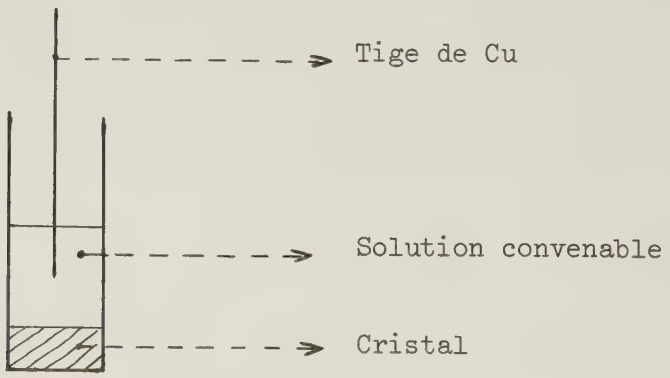
Le dosage par voie électrochimique à l'aide d'une électrode à cristal spécifique des ions Cu^{++} nous a paru tout à fait satisfaisant.

571) Description des électrodes

L'électrode de mesure est fournie par Orion sous le nom de modèle 94-29.

Le cristal qui la constitue est obtenu par coprécipitation de sulfure d'argent et de sulfure de cuivre. Ce cristal est protégé par le corps de l'électrode constitué d'une résine époxy particulièrement résistante à divers solvants et aux chocs.

Le fabricant ne précise pas la constitution interne de cette électrode, mais il est probable que le cristal est au contact de sa solution saturée dans laquelle plonge du Cu métallique. On pourrait représenter l'électrode par le schéma suivant :



Les ions Cu^{++} de la solution étudiée sont en excès par rapport à la quantité correspondant au produit de solubilité du cristal. Nous supposons que la constitution de l'électrode est telle que la réaction

$$Cu^{++} + 2\ e^{-} \rightleftarrows Cu \text{ peut seule se produire}$$

On sait que le potentiel d'une telle électrode est

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{2} \text{ Log } \gamma c_{Cu^{++}}$$

où E° dépend de la constitution interne de l'électrode.

$= Ne$ N = nombre d'Avogadro.

e = charge de l'électron.

R est la constante des gaz parfaits.

T est la température absolue.

$\gamma c_{Cu^{++}}$ l'activité de l'ion Cu^{++} dans la solution à étudier.

$\gamma \to 1$ si $c \to 0$

Le terme γ tient compte du fait que les solutions étudiées ne sont pas parfaites : il dépend en particulier de la force ionique du milieu.

La formule de Nernst montre que si l'activité des ions cuivriques d'une solution passe de la valeur $(\gamma c_{Cu^{++}})$ à $(10.\gamma c_{Cu^{++}})$. Le potentiel de l'électrode à 25°C est augmenté de 29,6 mV.

L'électrode de référence, fournie par le même fabricant, est une électrode à AgCl ($Ag/AgCl/Cl^{-}$) contenant divers adjuvants destinés à améliorer ses qualités. Il n'est pas souhaitable que les divers constituants de l'électrode de référence diffusent dans la solution à étudier. Afin de l'éviter, on place autour de l'électrode proprement dite une solution saturée d'un sel en présence de ses cristaux. Cette couche extérieure est elle-même séparée de la solution à étudier par une matière poreuse. Le rôle de ce sel est donc à la fois de séparer l'électrode de référence de la solution à doser et de conduire le courant*.

---

*Nous remercions Monsieur GILBERT, Professeur, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne.

Nous remercions Monsieur PRADEL, Chef de travaux à l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne : il a eu l'amabilité de mettre à notre disposition ces électrodes et les appareils de mesure qui leur sont associés.

572) Mesure du potentiel de l'électrode

Thermostatation : Les potentiels des électrodes de mesure et de référence étant fonctions de la température, les mesures sont effectuées dans une cellule thermostatée à 25°C ± 0,05°C.

Agitation : Les dimensions des électrodes sont telles qu'il est nécessaire d'utiliser 100 cm^3 de solution afin d'effectuer une mesure. D'une part, pour des raisons évidentes de bonne thermostatation d'une telle quantité, il est nécessaire d'agiter la solution. D'autre part, l'équilibre des potentiels des électrodes est plus vite atteint lorsque la solution est agitée. Pour ce faire nous avons utilisé un agitateur magnétique tournant à environ 100-150 tours/min, vitesse optimum conseillée par le constructeur. Cette vitesse de rotation est faible et nous espérons ainsi ne pas avoir cassé le DNA étudié.

Appareil de mesure du potentiel : La mesure du potentiel de l'électrode nécessite l'emploi d'un millivoltmètre dont l'impédance vaut au moins 10^{13} . Le millivoltmètre enregistreur dont nous disposions ayant une impédance trop faible, nous l'avons couplé avec un pH mètre "Tacussel Isis 4000".

Au cours des expériences que nous avons faites la sensibilité de l'appareil enregistreur est telle que 1 mV est représenté par 2 cm, le bruit de fond étant de l'ordre de 0,05 mV, soit 1 mm.

573) Inconvénients dus à la nature de l'électrode de référence

Le liquide conducteur externe de cette électrode étant NaCl saturé, il se produit, chaque fois que la solution à mesurer est de faible force ionique ($\sim 10^{-3}$ ion-g/l), une diffusion de NaCl dans cette solution (0,2 cm^3/h). Cette apparition de NaCl dans une solution qui initialement n'en contenait pas modifie de façon continue l'activité des ions Cu^{++}. Alors le potentiel de l'électrode ne peut pas se stabiliser avant que l'équilibre des forces ioniques ne soit réalisé, ce qui ne peut arriver qu'au bout d'un temps de l'ordre de quelques jours.

574) Essais sur des solutions cuivriques sans DNA

Ces solutions contiennent 10^{-4} M $CuSO_4$

5.10^{-3} ion-g/l Na_2SO_4

Le potentiel E est enregistré pendant 3 heures : pendant cette durée sa valeur passe de 115 mV à 119 mV, soit en moyenne une dérive de 0,02 mV/min.

Si par addition de Na_2SO_4 1 M nous augmentons la force ionique, la faisant passer de $\mu = 5.10^{-3}$ ion-g/l à $\mu \sim 0{,}1$ ion-g/l en 10 s, on observe un abaissement de E puis au bout d'une minute environ l'établissement d'un équilibre : E est stabilisé à 115 mV et nous n'avons pas observé de dérive même après 45 min d'enregistrement.

Donc l'augmentation de la force ionique μ ramène le potentiel E à la valeur qu'il avait en début de mesure à $\mu = 5.10^{-3}$ ion-g/l et permet la stabilisation de E.

Ayant observé ceci, nous avons pu mettre au point la méthode de dosage des ions Cu^{++} au cours de la "renaturation" du DNA.

575) Dosage des ions Cu^{++} au cours de la "renaturation" du DNA

La solution-mère de DNA V 371 a été préparée dans les conditions habituelle. Les solutions étudiées sont obtenues à partir de celle-ci par dilution et contiennent :

4 à 5.10^{-5}	DNA-P/l
5.10^{-3} ion-g/l	Na_2SO_4
10^{-4} M	$CuSO_4$

Les différentes phases du traitement des solutions cuivriques de DNA sont : "dénaturation", attente, "renaturation".

"Dénaturation" :

$n = 100\ cm^3$ dans une fiole préchauffée à T_1.
$T_1 = 54,8°C$.
$\Delta = 20$ min.

Attente :

$\theta = 30$ min dans la cellule de mesure thermostatée
$T_2 = 25,25°C$.

Afin d'éviter une trop grande diffusion de NaCl dans la solution avant "renaturation", la mesure de E n'est commencée qu'à partir de $\theta = 25$ min. Pendant les 5 dernières minutes de θ, l'équilibrage de température et des potentiels d'électrodes a le temps de s'établir.

"Renaturation" :

Au bout de 30 min, l'addition de 3 cm^3 de Na_2SO_4 1 M dans les 100 cm^3 de solution fait passer en 10s la force ionique de $\mu = 5.10^{-3}$ ion-g/l à $\mu \sim 0,1$ ion-g/l. Le potentiel enregistré E passe de la valeur E_1 de l'état "dénaturé"à la valeur E_2 de l'état "renaturé" au cours du temps t : nous enregistrons $E = f(t)$.

- Chapitre III -

RESULTATS EXPERIMENTAUX

ANALYSE PHENOMENOLOGIQUE

Les résultats expérimentaux vont être présentés dans le but d'illustrer, puis d'utiliser la règle phénoménologique énoncée au(ch. I - 1).

La motivation du choix des systèmes a été exposée au(Ch. I - 2).

Rappelons que les cinétiques de "renaturation" du DNA en présence d'ions métalliques ont été suivies par spectrophotométrie U.V. Le processus étudié s'accompagne d'un phénomène d'hypochromicité, la densité optique diminuant de la valeur initiale d_1 à la valeur finale d_2 ($d_1 / d_2 \sim 1,45$).

La nature des solutions et les méthodes expérimentales ont été décrites au Ch. II - 5.

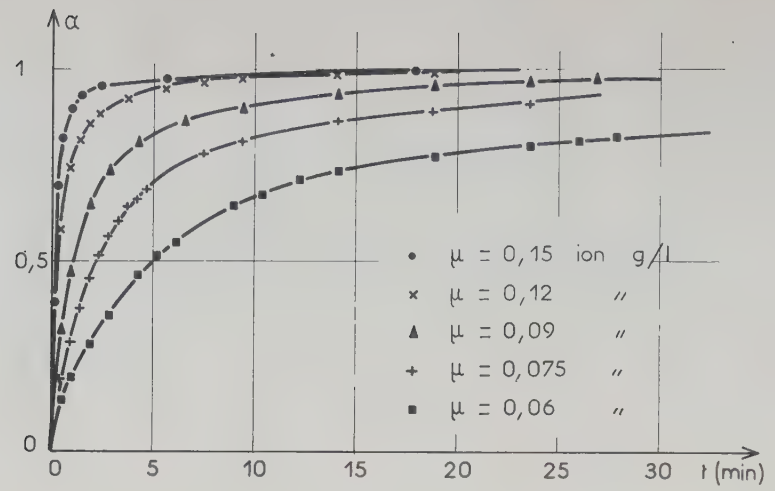


Fig. 9

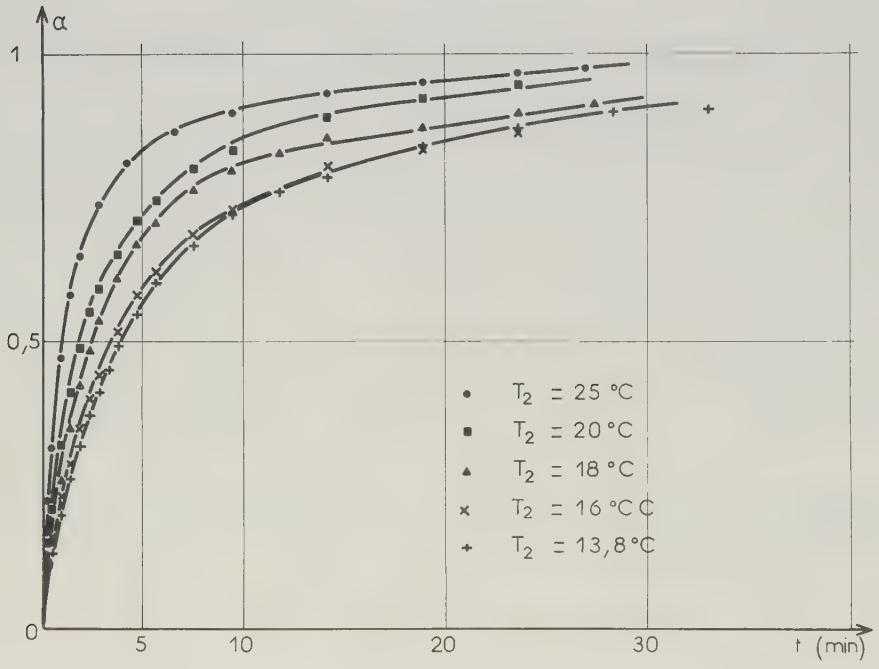


Fig. 10

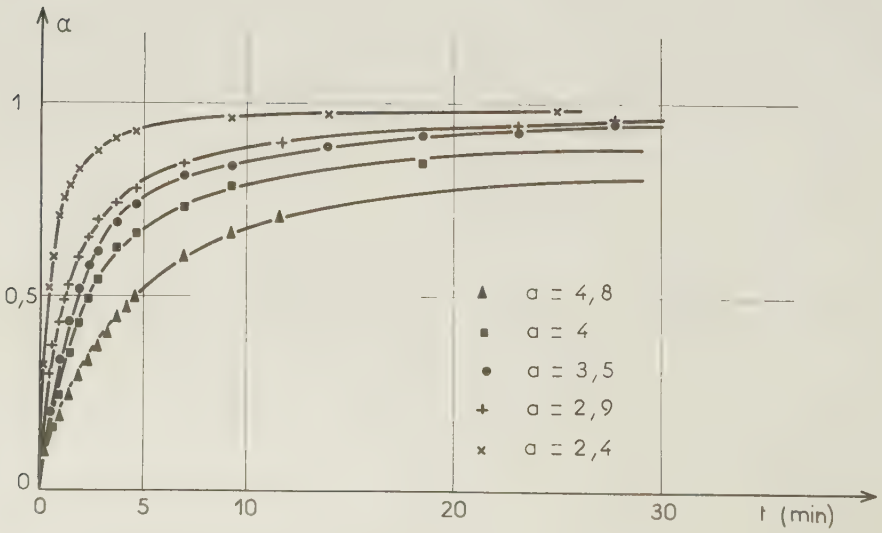


Fig. 11

1) ILLUSTRATION DE LA REGLE

Considérons un système constitué par du DNA de thymus de veau (V 309) mis en solution en présence d'ions Cu^{++}.

Les principales variables caractérisant le système DNA - Cu^{++} au cours de la "dénaturation" et de la "renaturation" sont la concentration c des solutions de DNA, la température T_1 de la "dénaturation" qui a lieu pendant le temps Δ, la température T_2 à laquelle séjourne la solution pendant le temps θ, la force ionique μ, la quantité $a = \frac{Cu^{++}}{DNA - P}$; cette liste n'étant probablement pas exhaustive.

La vitesse de "renaturation" est une fonction croissante de μ, T_2, décroissante de a, θ , Δ , T_1, c[+].

Cette étude est relative aux "renaturations" réalisées en fonction des paramètres μ, T_2 et a, le spectrophotomètre étant le Cary 14 (29).

Les conditions expérimentales communes à l'étude de l'influence de ces paramètres sont :

Nombre de cm^3 de solution cuivrique dénaturés	$n = 10\ cm^3$
Température de "dénaturation"	$T_1 = 55°\ C$
Durée de traitement dénaturant	$\Delta = 15$ min
Temps d'attente à la température T_2	$\theta = 30$ min

Les figures (9), (10), (11) représentant le taux de "renaturation" $\alpha = \varphi(t)$ pour le DNA V 309 (t étant le temps écoulé après le début de la "renaturation").

Les différentes valeurs des paramètres envisagés étant :

μ = 0,15 ; 0,12 ; 0,09 ; 0,075 ; 0,06 ion-g/l ($T_2 = 25°C$; a = 2,4 ; $T_1 = 55°C$)

T_2= 25 ; 20 ; 18 ; 16 ; 13,8° C (μ = 0,09 ion-g/l ; a = 2,4 ; $T_1 = 55°$ C)

1/a = 0,21 ; 0,25 ; 0,29 ; 0,34 ; 0,41 (μ = 0,12 ion-g/l ; $T_2 = 25°C$; $T_1 = 55°$ C)

[+] Rappelons que la concentration en DNA est souvent exprimée en unité D.O. Dans l'exposé des résultats, nous avons utilisé cette dernière notation.

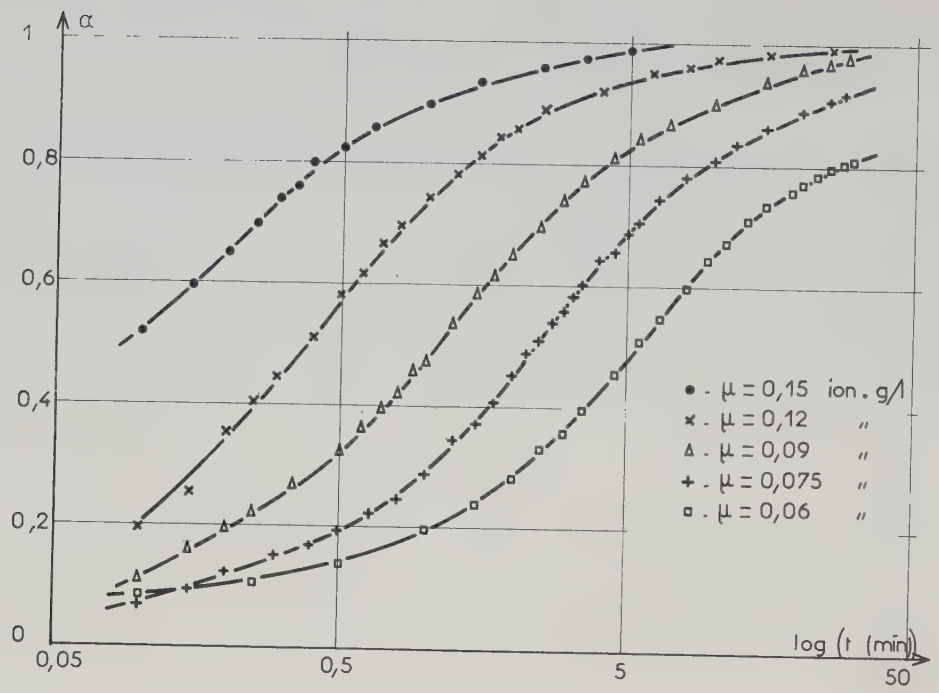

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,05
0,5
5
50
log (t (min))
• - μ = 0,15 ion. g/l
× - μ = 0,12 "
Δ - μ = 0,09 "
+ - μ = 0,075 "
□ - μ = 0,06 "

Fig. 12

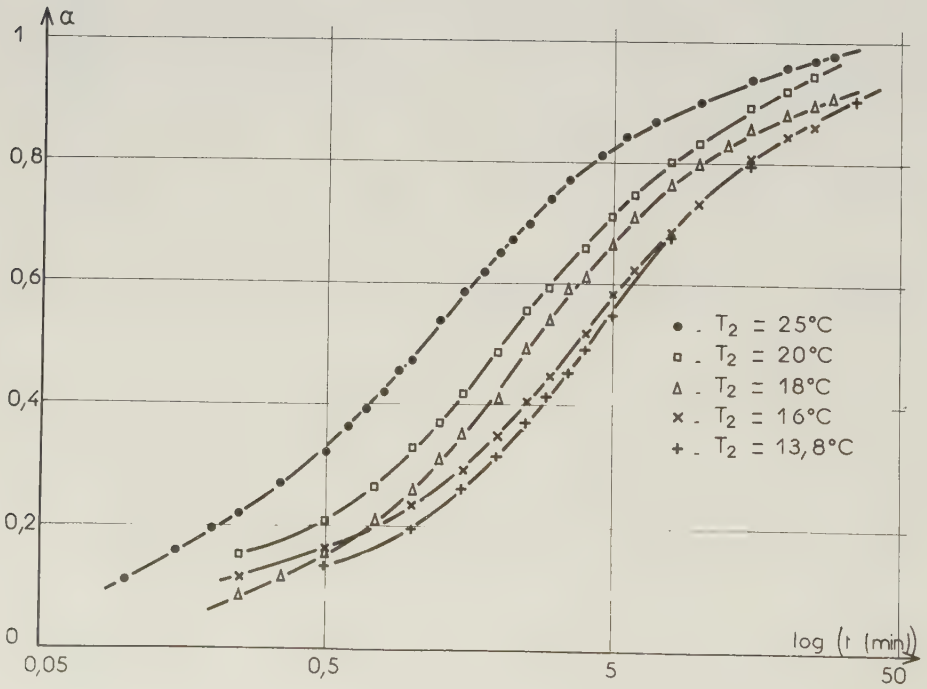

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,05
0,5
5
50
log (t (min))
• . T2 = 25°C
□ . T2 = 20°C
Δ . T2 = 18°C
× . T2 = 16°C
+ . T2 = 13,8°C

Fig. 13

Nous nous proposons de montrer que l'étude quantitative, faite en fonction des paramètres μ, T_2 et a, vérifie la règle phénoménologique (Ch. I - 1).

Dans le cas de la cinétique de "renaturation" des solutions cuivriques de DNA, seule une variation brusque du paramètre μ déclenche l'évolution du système de l'état dénaturé A vers l'état renaturé B.

La propriété avec laquelle on suit l'évolution est la densité optique mesurée à 260 nm. Le degré d'évolution est alors :

$$\alpha_d = \frac{d - d_1}{d_2 - d_1} = \frac{d_1 - d}{d_1 - d_2}$$

11) *Mise en évidence de la superposition des courbes* $\alpha = \varphi$ *(Log t)*

Les figures (12), (13) et (14) représentent respectivement $\alpha = \varphi$ (Log t) pour les valeurs de :

μ = 0,15 ; 0,12 ; 0,09 ; 0,075 ; 0,06 ion.g/l (T_2 = 25° ; a = 2,4)
T_2 = 25 ; 20 ; 18 ; 16 ; 13,8° C (μ = 0,09 ; a = 2,4)
1/a = 0,21 ; 0,25 ; 0,29 ; 0,34 ; 0,41 (μ = 0,12 ; T_2 = 25°)

Les figures (15), (16) et (17) représentent les courbes uniques obtenues par superposition après translation le long de l'axe des abscisses des courbes des figures (12), (13) et (14), la courbe de base sur laquelle se font les superpositions étant T_2 = 25°C ; μ = 0,09 ; a = 2,41. Ces trois dernières courbes peuvent, d'ailleurs, aux erreurs d'expérience près (Ch. III - 4) se ramener à une courbe unique par la même transformation[+] (fig. 18).

12) *Etablissement des fonctions* $k_j = f(p_j)$

De l'amplitude des translations, on peut déduire Log k_μ, Log k_{T_2} et Log k_a.

Les figures (19), (20) et (21) représentant Log $k_j = f(p_j)$ montrent que ce sont des droites, à condition de porter en abscisses :

$$\mu^{1/2}, \; T_2^{-1}, \; a^{-1}.$$

Il en résulte que, si l'on prend pour référence la courbe μ = 0,09 ion-g/l, T_2 = 298° K, a = 0,42 :

[+] Il est commode de tracer les différentes courbes sur papier logarithmique transparent, ce qui facilite l'observation de la superposition des courbes.

$$\frac{k_\mu}{k_{0,09}} = \exp\left[B\left(\sqrt{\mu} - \sqrt{0,09}\right)\right] \qquad B = 25 \text{ si } \mu \text{ est exprimé en ion-g/l.}$$

$$\frac{k_{T_2}}{k_{298}} = \exp\left[-C\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{298}\right)\right] \qquad C = 12\,000 \text{ si } T_2 \text{ est exprimée en degré Kelvin.}$$

Cette expression qui ressemble à la loi d'ARRHENIUS permet de déterminer une énergie d'activation de l'ordre de 24 kcal.

$$\frac{k_a}{k_{0,42}} = \exp\left[D\left(\frac{1}{a} - 0,42\right)\right] \qquad D = 12,5$$

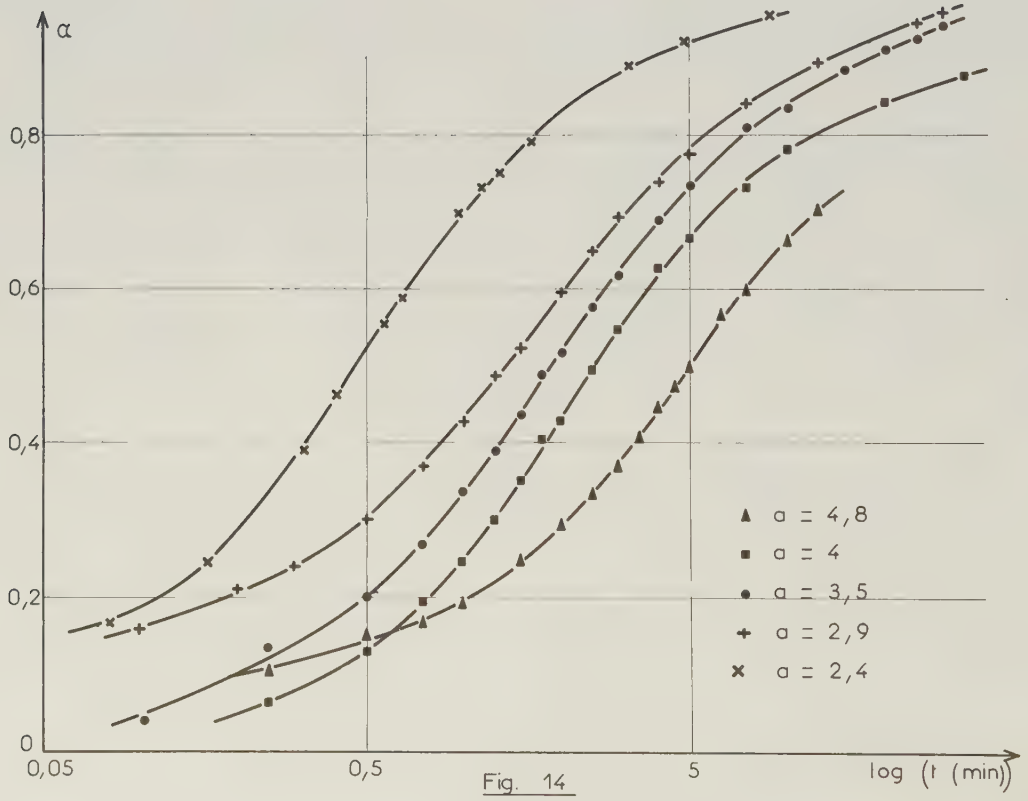


Fig. 14

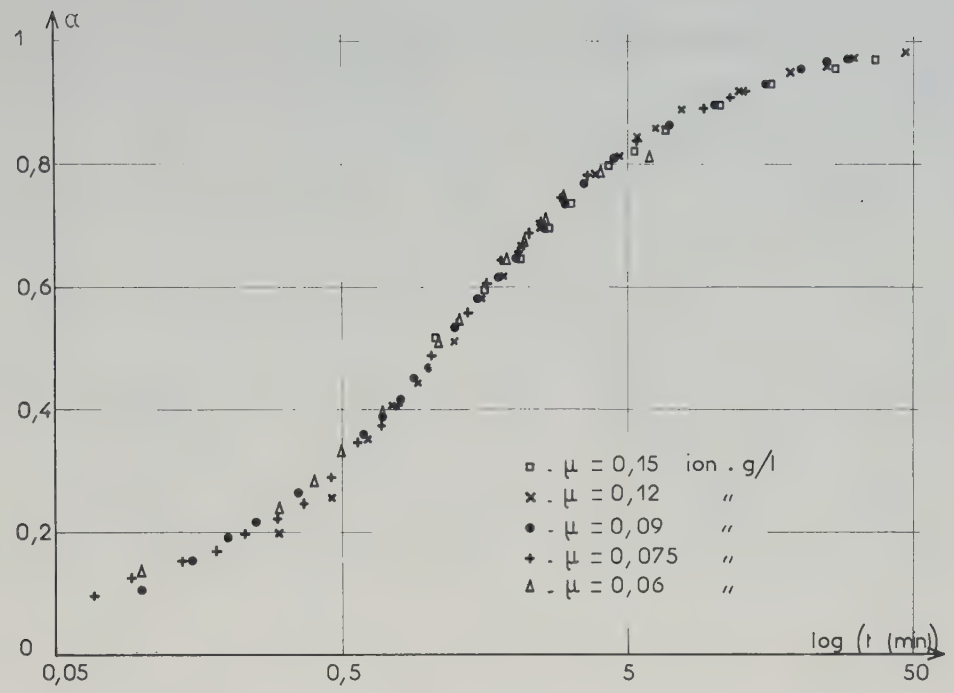

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,05
0,5
5
50
log (t (min))
□ . μ = 0,15 ion . g/l
× . μ = 0,12 "
● . μ = 0,09 "
+ . μ = 0,075 "
△ . μ = 0,06 "

Fig. 15

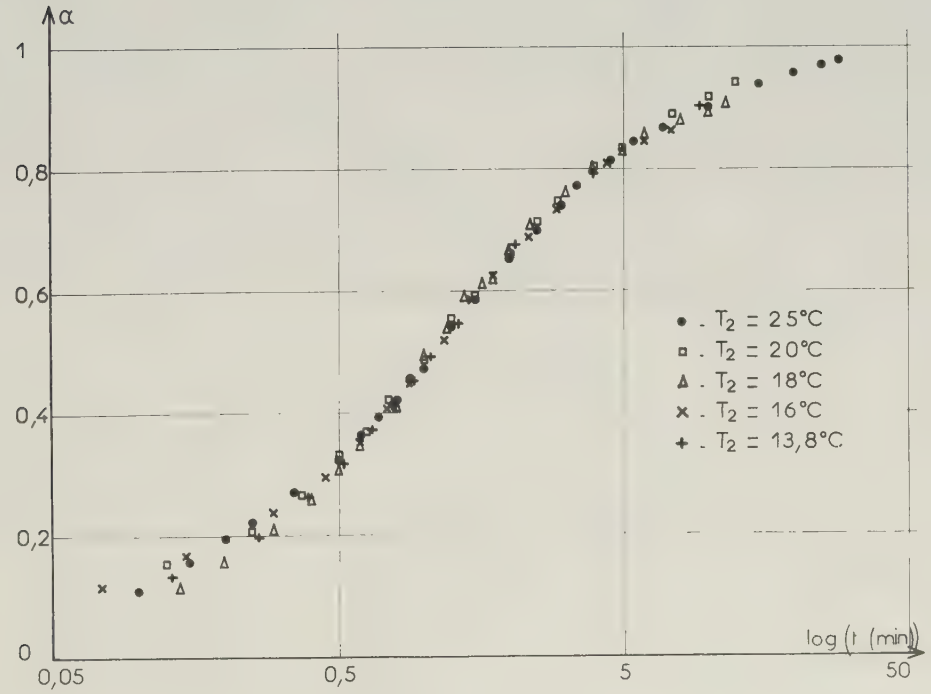

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,05
0,5
5
50
log (t (min))
● . T2 = 25°C
□ . T2 = 20°C
△ . T2 = 18°C
× . T2 = 16°C
+ . T2 = 13,8°C

Fig. 16

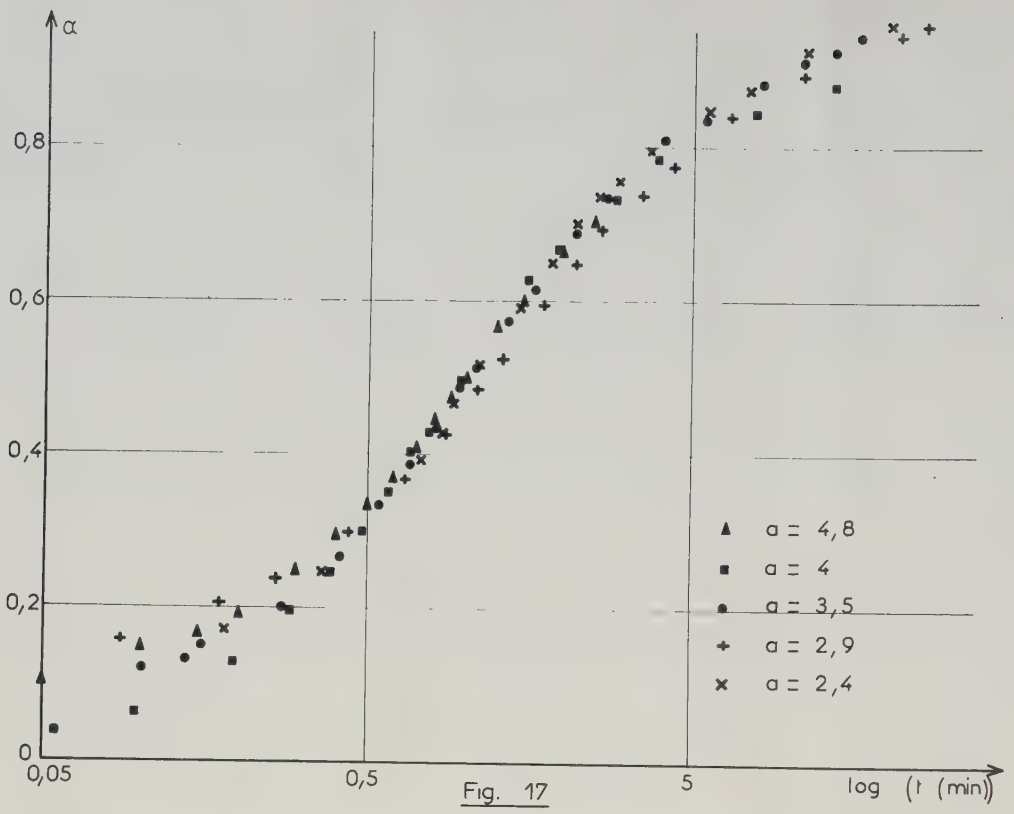

α
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,05
0,5
5
log (t (min))
a = 4,8
a = 4
a = 3,5
a = 2,9
a = 2,4

Fig. 17

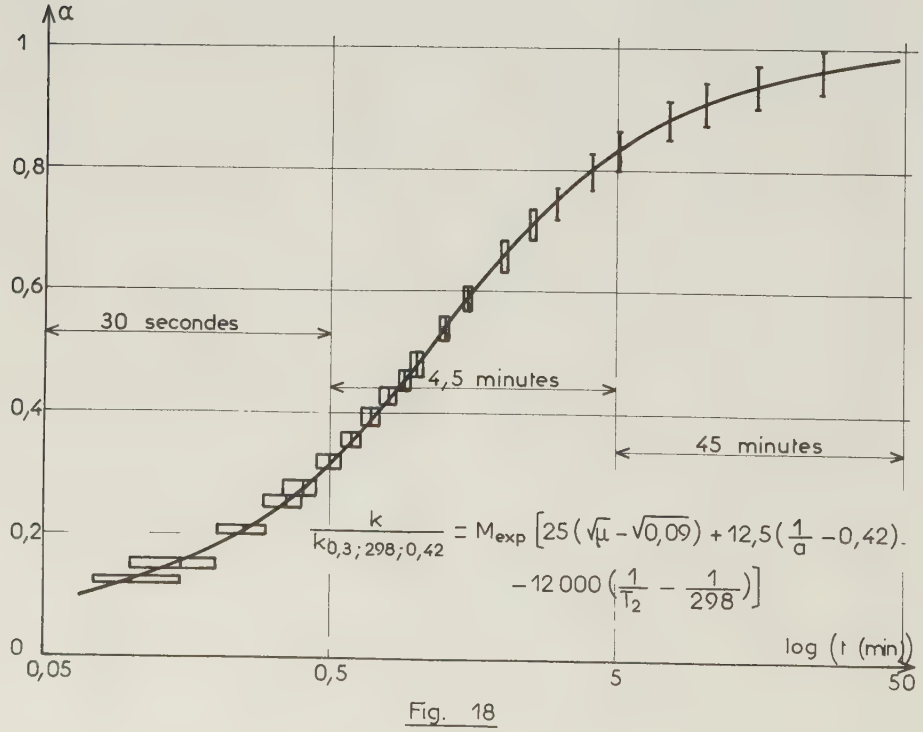

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
30 secondes
4,5 minutes
45 minutes
$\frac{k}{k_{0,3;298;0,42}} = M_{exp}\left[25\left(\sqrt{\mu}-\sqrt{0,09}\right)+12,5\left(\frac{1}{a}-0,42\right).\right.$
$\left.-12\,000\left(\frac{1}{T_2}-\frac{1}{298}\right)\right]$
0,05
0,5
5
50
log (t (min))

Fig. 18

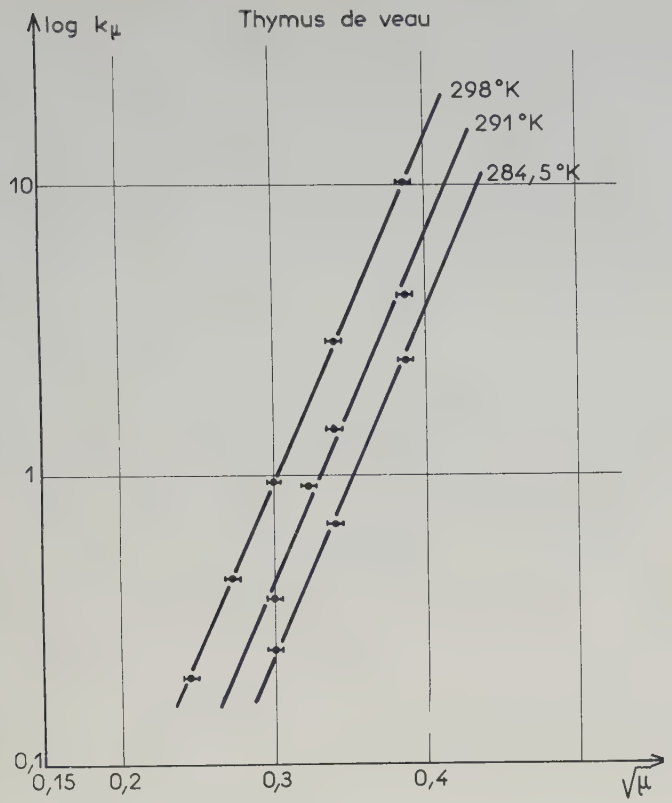


Fig. 19

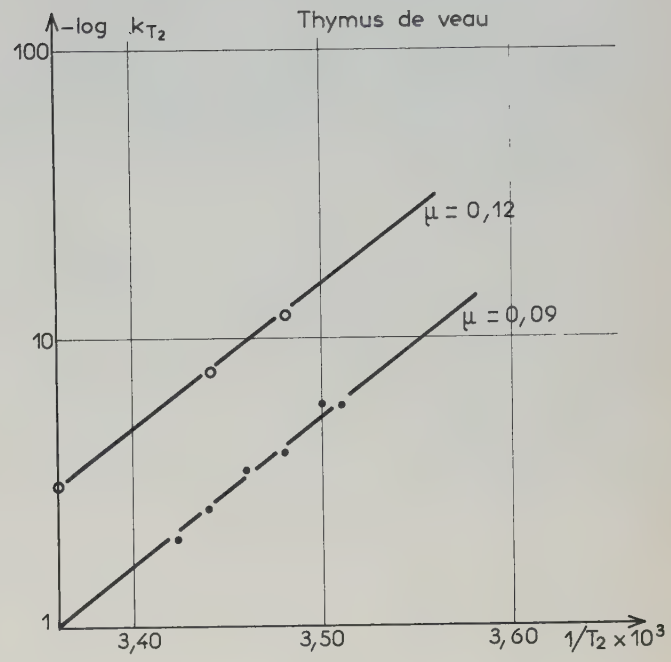


Fig. 20

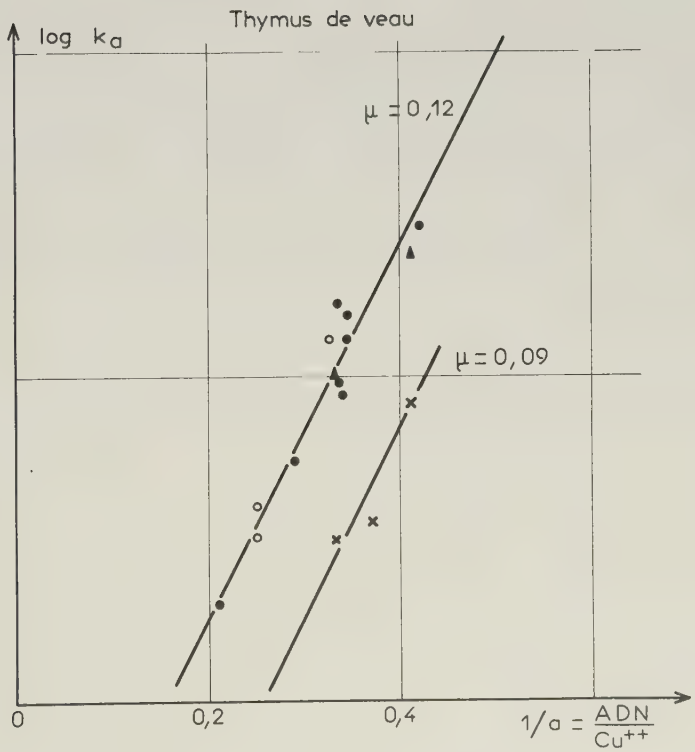


Fig. 21

13) *Action simultanée de plusieurs paramètres*

On constate sur les figures (19), (20), (21) que les droites $\log k_\mu = f(\sqrt{\mu})$, tracées lorsque T_2 prend trois valeurs différentes, sont parallèles ; il en est de même pour la droite $\text{Log } k_{T_2} = f(\frac{1}{T_2})$ obtenue avec différentes valeurs de μ.

Supposons qu'une "renaturation" soit effectuée dans des conditions telles que tous les paramètres, sauf μ et T_2, prennent des valeurs identiques à celles de la courbe de référence. Le parallélisme des droites $\text{Log } k_\mu = f(\sqrt{\mu})$, pour différentes valeurs de T_2, montre que le coefficient k_{μ, T_2} correspondant à l'action simultanée des deux paramètres est tel que :

$$\text{Log } k_{\mu, T_2} = \text{Log } k_\mu + \text{Log } k_{T_2}$$

soit

$$k_{\mu, T_2} = k_\mu \cdot k_{T_2}$$

On montrerait de même que :

$$k_{\mu, a} = k_\mu \cdot k_a$$

$$k_{T_2, a} = k_{T_2} \cdot k_a$$

Ainsi, nous vérifions que si plusieurs paramètres prennent simultanément des valeurs différentes :

$$\alpha = \varphi\,(t \textstyle\prod_j k_j)$$

On peut maintenant expliciter k :

$$k = M \cdot k_\mu \cdot k_{T_2} \cdot k_a$$

Signification et limites de validité de l'équation globale :

$$\frac{k}{k_{0,3;\ 298;\ 0,42}} = M \exp\left[B\,(\sqrt{\mu} - 0,3) - C\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{298}\right) + D\left(\frac{1}{a} - 0,42\right) \right]$$

Le terme M tient compte des paramètres non dénombrés par l'expérimentateur. Ecrire ceci suppose que les lois $k_{p_i} = f(p_i)$ peuvent être exprimées sous forme d'exponentielles.

Dans le cas particulier du système que nous envisageons, les domaines de variation des paramètres p_i dénombrés sont assez faibles pour que, compte tenu de la précision sur les superpositions de courbes $\alpha = \varphi(\text{Log } t)$, on puisse trouver un exposant b tel que :

$$\text{Log} \frac{k_{p''_i}}{k_{p'_i}} = a\,(p''_i{}^{b} - p'_i{}^{b}) \quad (\text{Ch. I - 1}).$$

Si nous considérons les valeurs aux limites de l'équation globale, nous pouvons tout d'abord remarquer que si μ prend la valeur zéro, la transformation étudiée est impossible et si $a = 0$, le système étudié n'existe pas. L'équation globale que nous avons donnée est valable dans le domaine expérimental exploré :

$$\mu > 0{,}06 \text{ ion.g/l}$$

$$0 < T_2 < 25^\circ \text{ C}$$

$$a \geqslant 2$$

Nous montrons ainsi, à l'aide de trois paramètres agissant sur le système DNA - Cu^{++}, que les cinétiques de "renaturations" peuvent se ramener à :

- une équation : l'expression de k écrite ci-dessus.
- une courbe unique (fig. 18).

Remarque

Les erreurs sur B d'une part, C et D d'autre part, sont au plus égales respectivement à 12 % et 9 %.

2) ETUDE D'AUTRES SYSTEMES

Des études complémentaires ont été effectuées sur d'autres systèmes que le DNA de thymus de veau en présence d'ions Cu^{++}. De tels systèmes peuvent être obtenus soit par modification de la nature de l'ion métallique, soit par utilisation d'un DNA extrait de source différente.

Comme nous l'avons déjà vu (Ch. II - 2), de même que les ions Cu^{++}, les ions Zn^{++} permettent la "renaturation" totale du DNA "dénaturé" thermiquement. Nous avons étudié des cinétiques de "renaturation" de solutions zinciques de DNA.

Les DNA envisagés autres que le DNA de thymus de veau V 309 sont :

- le DNA de thymus de veau V 371
- un DNA de E. Coli
- un DNA de H. Influenzae

Certaines études ont été faites en utilisant le spectrophotomètre Cary 14, d'autres à l'aide du Cary 16 (voir Ch. II - 5).

L'illustration de la règle phénoménologique (Ch. I - 1) ayant été présentée de façon détaillée à propos de la "renaturation" du DNA de thymus de veau V 309 en présence d'ions Cu^{++}, nous présenterons les résultats concernant les autres systèmes envisagés de façon plus succincte.

On précisera la nature du système, le spectrophotomètre utilisé et les paramètres p_i étudiés de la façon suivante :

DNA + ions p_i = ---------
Cary N -- = ---------
-- = ---------

Ensuite, on portera $\alpha = \psi(\log t)$ pour chaque p_i étudié, suivie de $\alpha = \psi(\log t)$ "unique" et de $\alpha = \psi(\log t)$ totale caractéristique du système étudié.

On précisera enfin les fonctions $\text{Log } k_{p_i} = f(p_i)$ ou seulement le sens de la variation $k_{p_i} = f(p_i)$ si cette fonction n'est pas évidente.

V 371 + Cu^{++} non centrifugé Cary 16 : $\mu = 0{,}12$; $0{,}09$; $0{,}075$ ($T_2 = 25°$ C ; $a = 2{,}5$; $T_1 = 55°$ C)

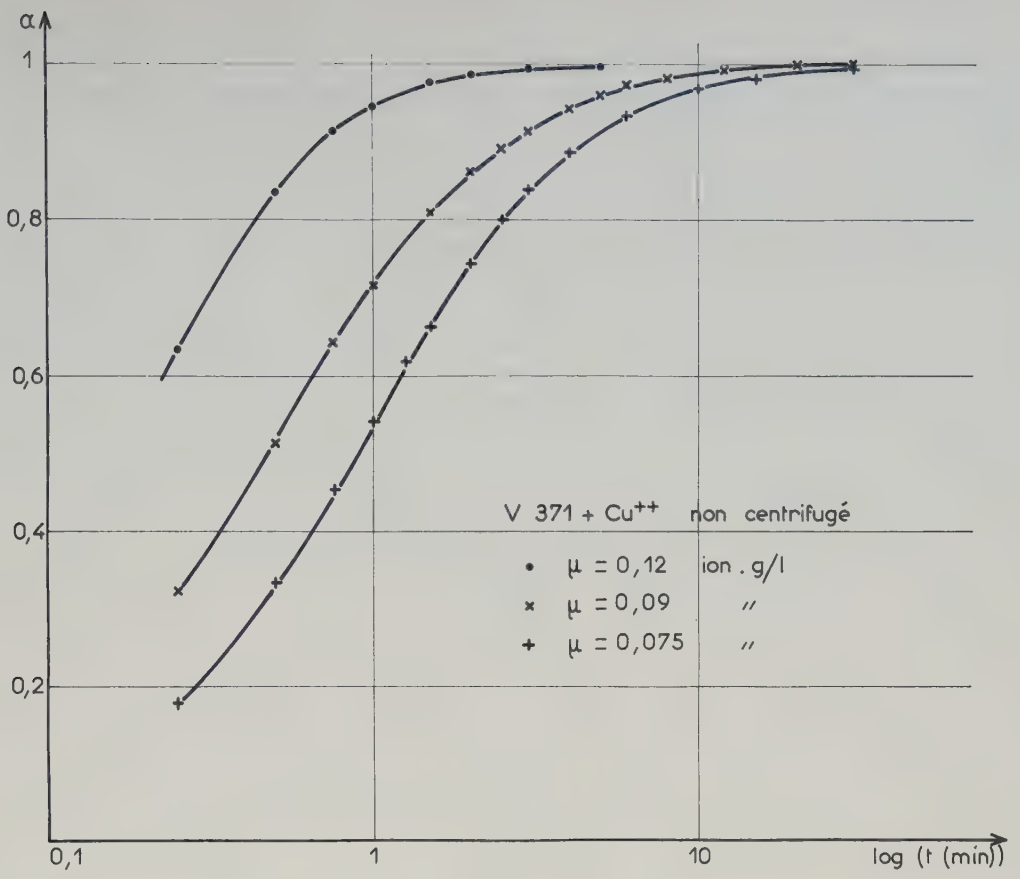

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0,1
1
10
log (t (min))
V 371 + Cu++ non centrifugé
• μ = 0,12 ion. g/l
× μ = 0,09 "
+ μ = 0,075 "

Fig. 24

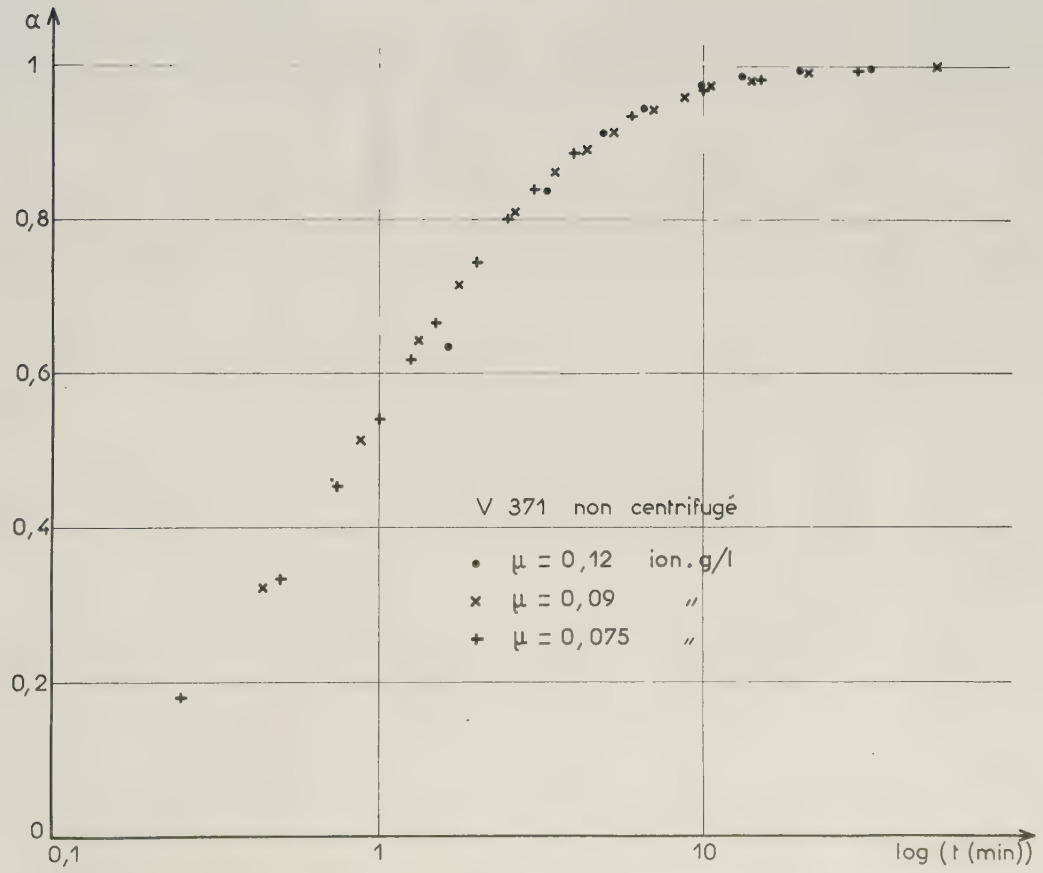

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log (t (min))
V 371 non centrifugé
• μ = 0,12 ion. g/l
× μ = 0,09 "
+ μ = 0,075 "

Fig. 25

Les courbes relatives à ces cinétiques sont portées sur les fig (24), (25) et (26).

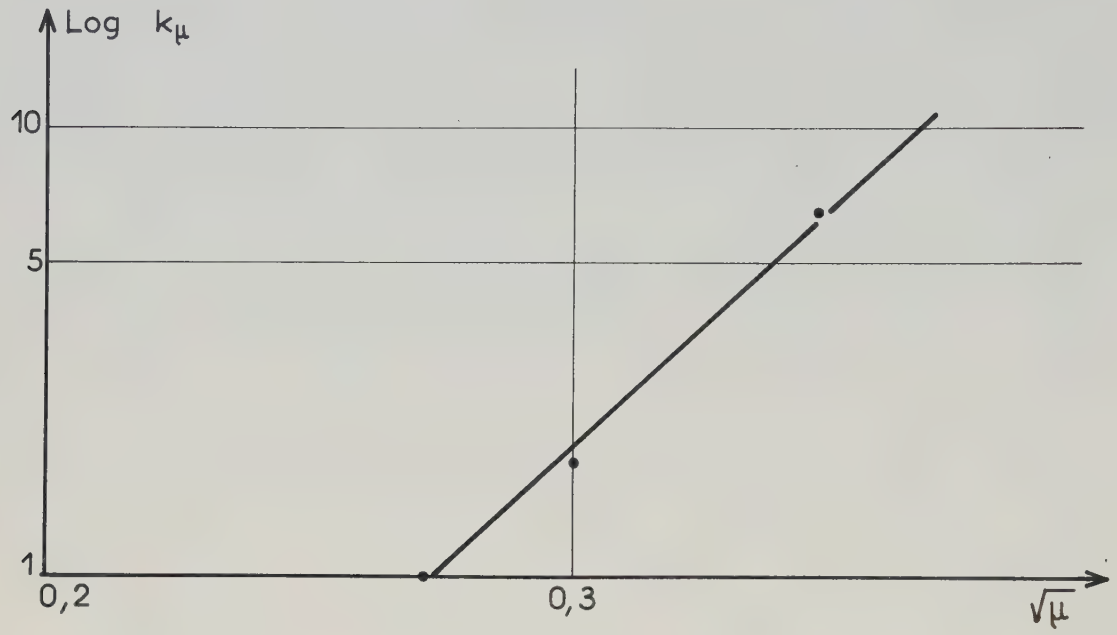


Fig. 26

V 371 + Cu^{++} Centrifugé 1 h 14000 t/min Cary 16

- μ = 0,15 ; 0,12 ; 0,09 ; 0,075 ion-g/l (T_2 = 25° C ; a = 2,6 ; T_1 = 55° C ; DO ~ 0,25)
- D.O.+ = 0,2572 ; 0,3630 ; 0,4978 ; 0,4954 (T_2 = 25° C ; a ~ 2,5 ; T_1 = 55° C ; μ = 0,15iong/l
- D.O. = 0,9811 ; 0,978 (T_2 = 25° C ; a 2,5 ; T_1 = 55° C ; μ = 0,30 ion-g/l)

Les courbes relatives à ces cinétiques sont portées sur les fig.(27, 28, 29), (30, 31), (32).

Nous avons vérifié que la loi Log k_μ = f ($\sqrt{\mu}$) était la même que celle qu'on avait établie lors de l'étude du DNA de thymus de veau V 309.

E. Coli 304 + Cu^{++} non centrifugé Cary 14 (30)

- μ = 0,12 ; 0,105 ; 0,09 ; 0,06 ion-g/l (T_2 = 25° C ; a = 2,5 ; T_1 = 55° C)
- T_2 = 25 ; 23 ; 21 ; 18 ; 15,25° C (μ = 0,12 ion-g/l ; a = 2,5 ; T_1 = 55° C)
- T_1 = 80 ; 70 ; 65 ; 55° C (μ = 0,12 ion-g/l ; a = 2,5 ; T_2 = 25° C)
- 1/a = 0,454 ; 0,366 ; 0,32 ; 0,259 ; 0,2 (μ = 0,12 ion-g/l ; T_1 = 55° C ; T_2 = 25° C)

+ Nous rappelons que une unité D.O. correspond à une concentration de $1,5.10^{-4}$ DNA - P/l.

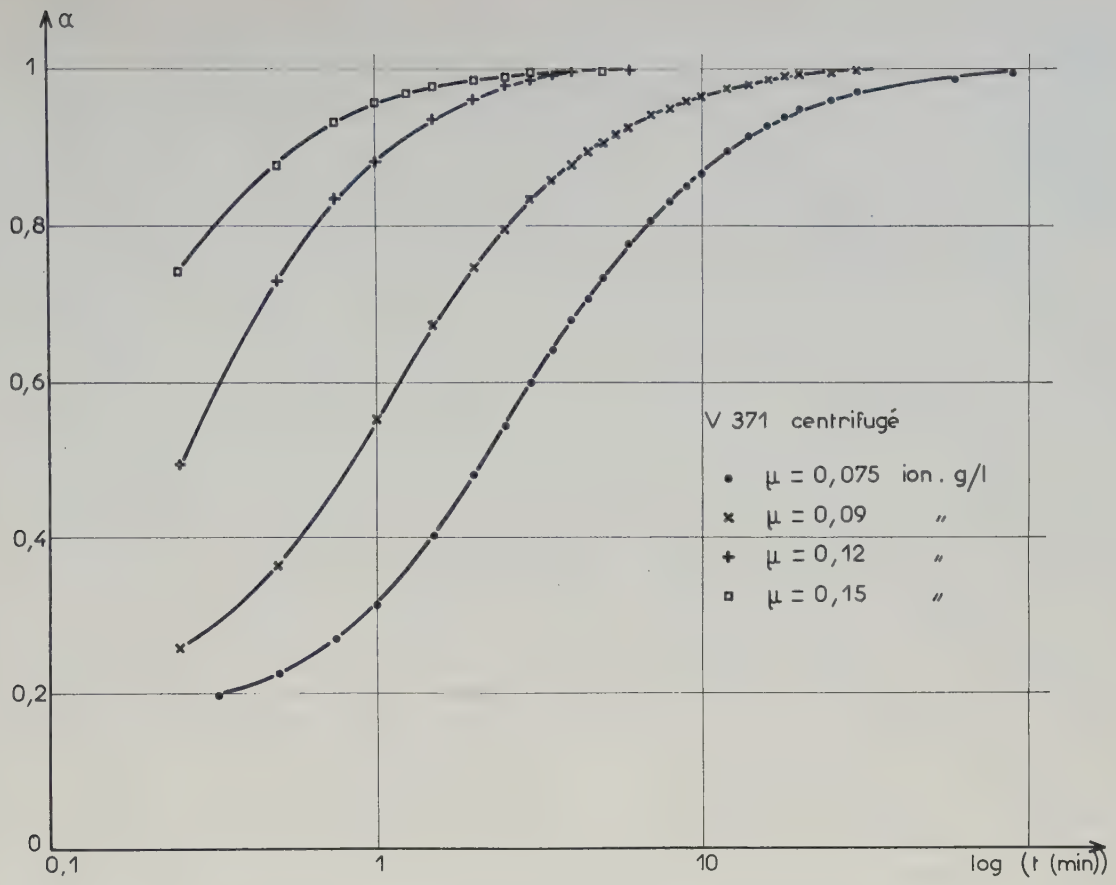

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log (t (min))
V 371 centrifugé
• μ = 0,075 ion. g/l
× μ = 0,09 "
+ μ = 0,12 "
▫ μ = 0,15 "

Fig. 27

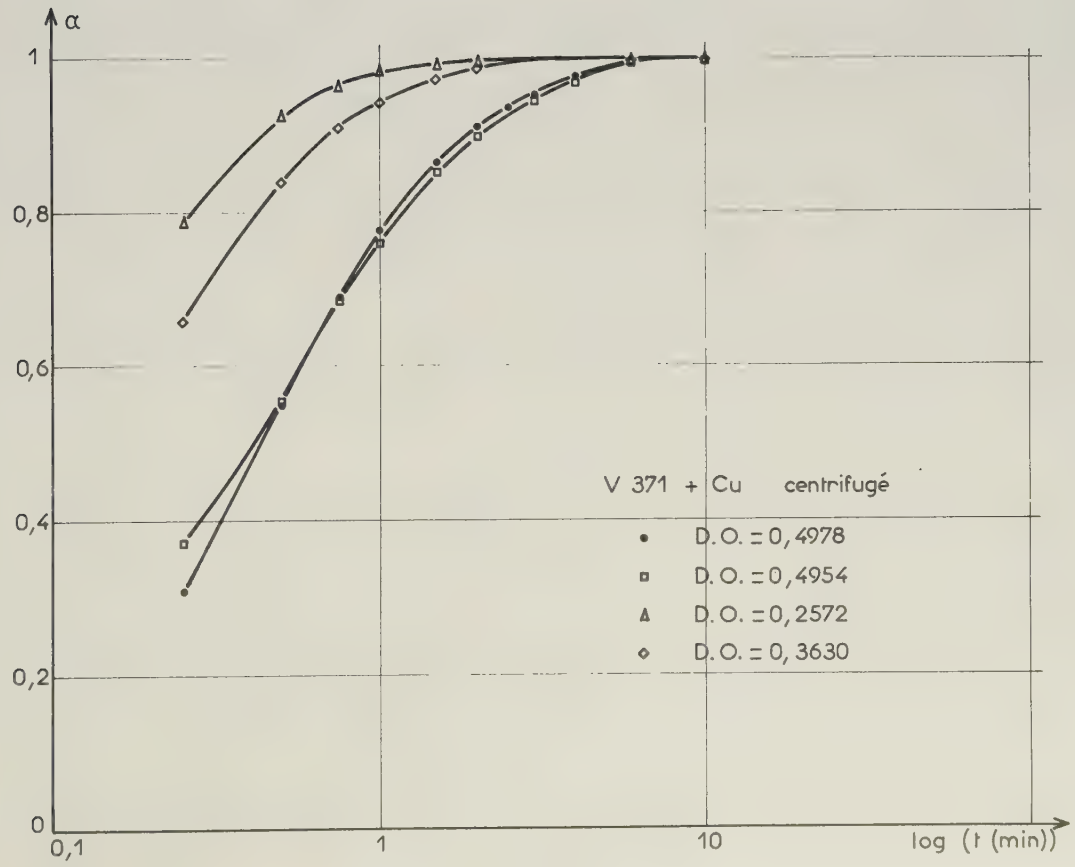

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log (t (min))
V 371 + Cu centrifugé
• D.O. = 0,4978
▫ D.O. = 0,4954
△ D.O. = 0,2572
◇ D.O. = 0,3630

Fig. 28

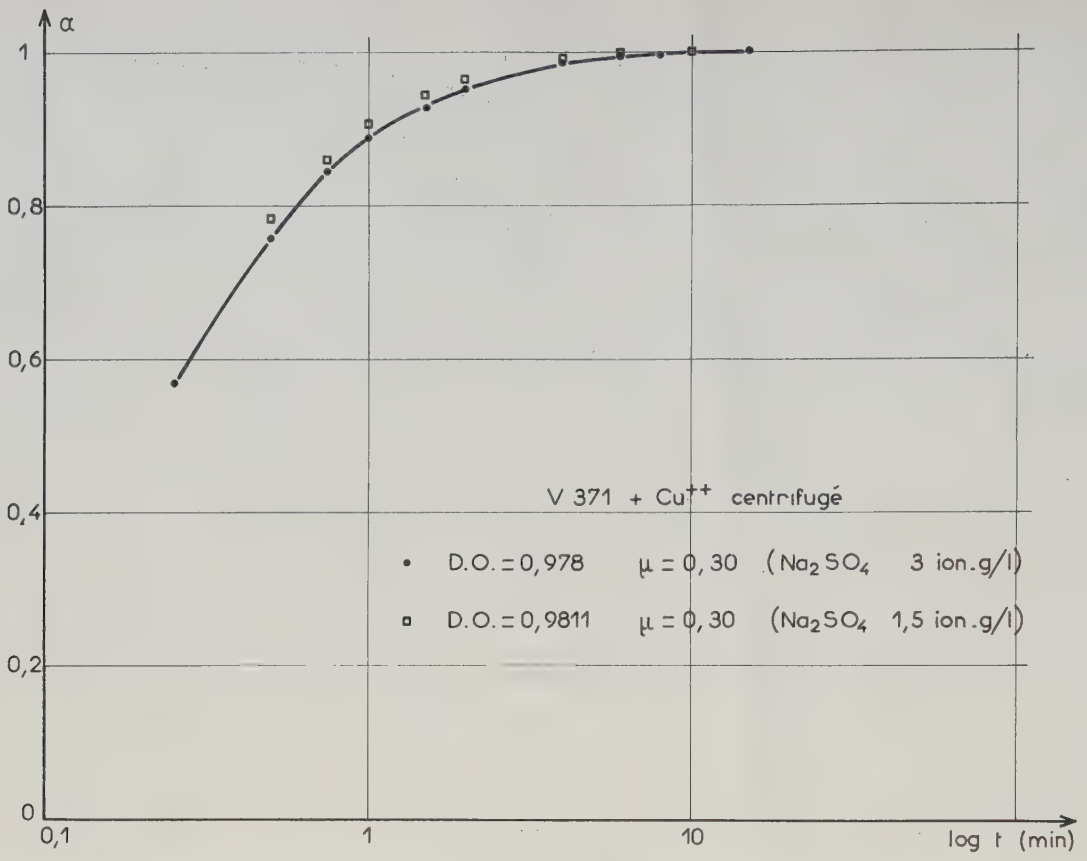

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
V 371 + Cu++ centrifugé
• D.O. = 0,978 μ = 0,30 (Na2SO4 3 ion.g/l)
▫ D.O. = 0,9811 μ = 0,30 (Na2SO4 1,5 ion.g/l)

Fig. 29

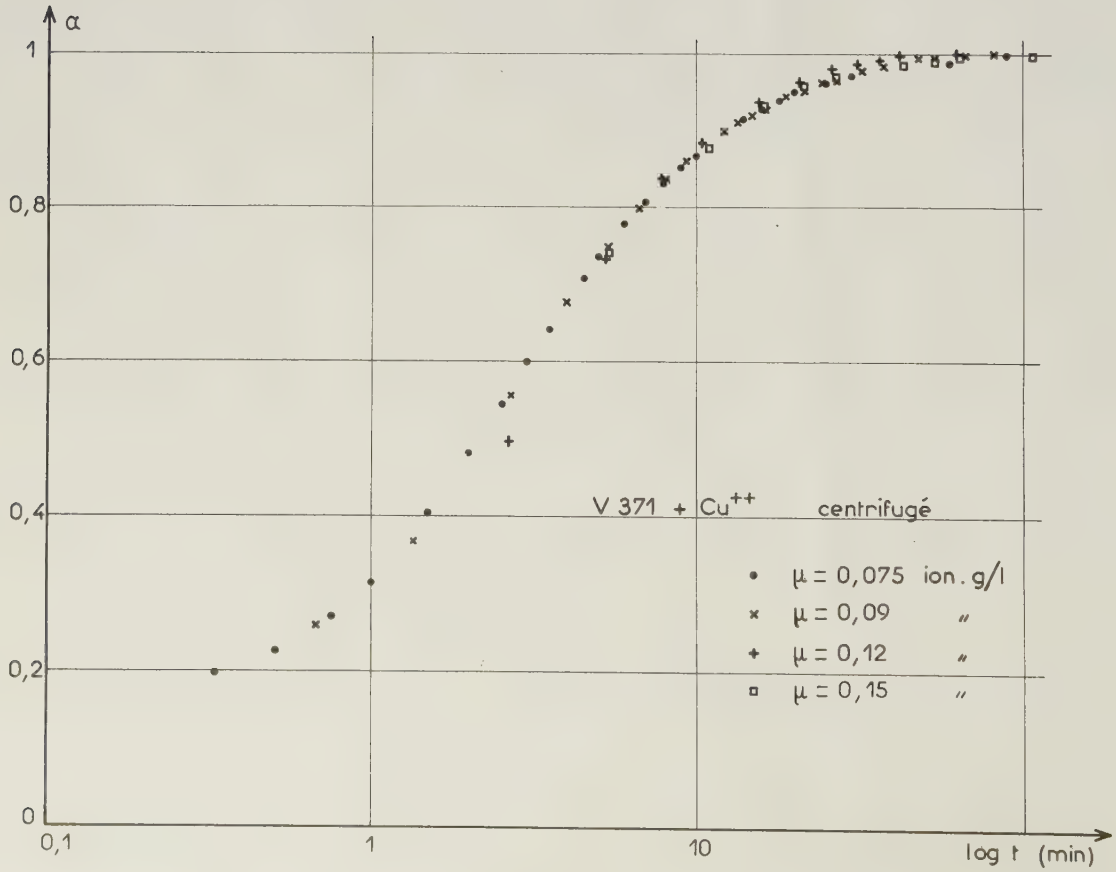

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
V 371 + Cu++ centrifugé
• μ = 0,075 ion.g/l
× μ = 0,09 "
+ μ = 0,12 "
▫ μ = 0,15 "

Fig. 30

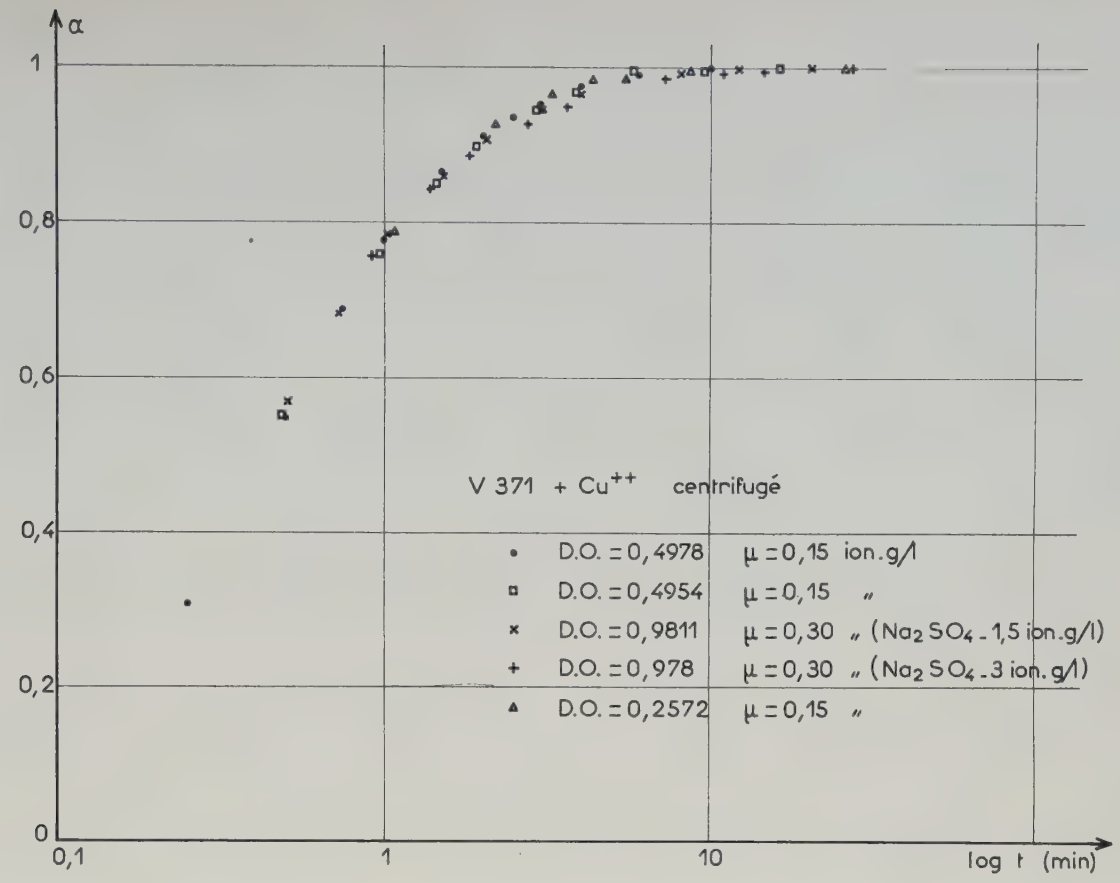

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
V 371 + Cu++ centrifugé
• D.O. = 0,4978 μ = 0,15 ion.g/l
□ D.O. = 0,4954 μ = 0,15 "
× D.O. = 0,9811 μ = 0,30 " (Na2SO4 - 1,5 ion.g/l)
+ D.O. = 0,978 μ = 0,30 " (Na2SO4 - 3 ion.g/l)
△ D.O. = 0,2572 μ = 0,15 "

Fig. 31

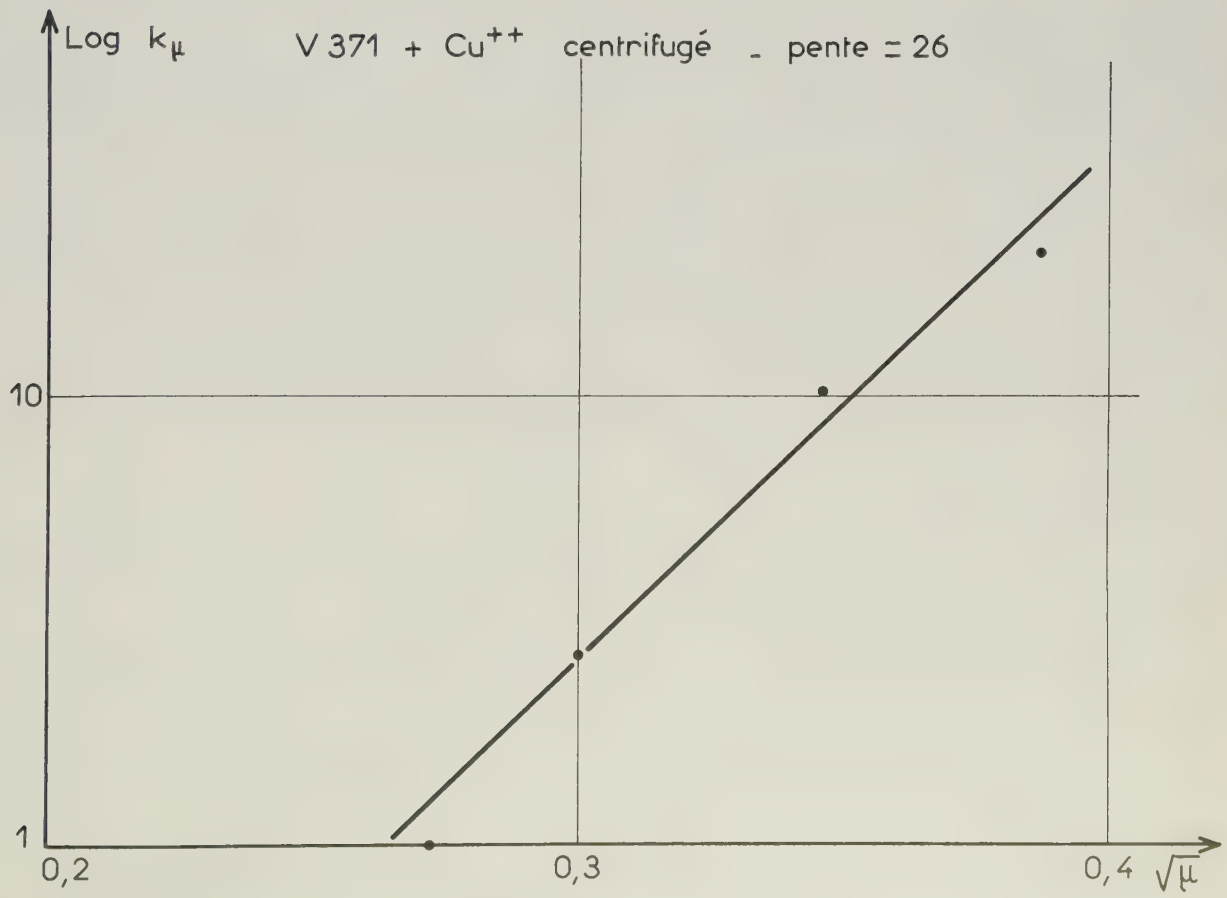

Log kμ
V 371 + Cu++ centrifugé - pente = 26
10
1
0,2
0,3
0,4 √μ

Fig. 32

Les courbes relatives à ces cinétiques sont portées sur les fig (33, 34, 35, 36), (37, 38, 39, 40), (41).

L'établissement des fonctions Log $k_{p_i} = f(p_i)$ fig (42, 43, 44) conduit, en choisissant pour courbe de référence :

$\mu = 0,12$ ion-g/l, $T_2 = 298$ ° K, $1/a = 0,42$, $T_1 = 55$° C

aux fonctions

$$\frac{k_\mu}{k_{0,12}} = \exp\left[B'(\sqrt{\mu} - \sqrt{0,12})\right] \qquad B' = 37 \text{ si } \mu \text{ est exprimé en ion-g/l}$$

$$\frac{k_{T_2}}{K_{298}} = \exp\left[-C'\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{298}\right)\right] \qquad C' = 13\,000 \text{ si } T_2 \text{ est exprimée en degré Kelvin.}$$

$$\frac{k_a}{k_{0,41}} = \exp\left[D'\left(\frac{1}{a} - 0,41\right)\right] \qquad D' = 9$$

Le domaine d'étude de l'influence du paramètre T_1 (de 55 à 80° C) est trop restreint pour qu'on puisse établir sans ambiguité la fonction Log $k_{T_1} = f(T_1)$.

E. Coli 304 + Cu^{++} centrifugé 1h, 14000 t/min Cary 16 : $\mu = 0,12$; 0,09 ; 0,075 ($T_2 = 25$°C ; $a = 2,5$; $T_1 = 55$° C)

Les courbes relatives à ces cinétiques sont portées sur les fig.(45), (46).

La fonction Log $k_\mu = f(\sqrt{\mu})$ est représentée par une droite de pente B' = 20, fig.(47). Cette valeur est très différente de celle qu'on a trouvée en "renaturant" le même échantillon de DNA non centrifugé (B' = 37).

H. Influenzae + Cu^{++} non centrifugé Cary 16 : $\mu = 0,09$; 0,075 ; 0,06 ; 0,045 ($T_2 = 25$°C ; $a = 2,5$; $T_1 = 55$°C)

Les courbes relatives à ces cinétiques sont portées sur les fig (48) - (49).

La pente de la droite Log $k_\mu = f(\sqrt{\mu})$, fig (50), est égale à 25, comme celle des "renaturations" du DNA de thymus de veau.

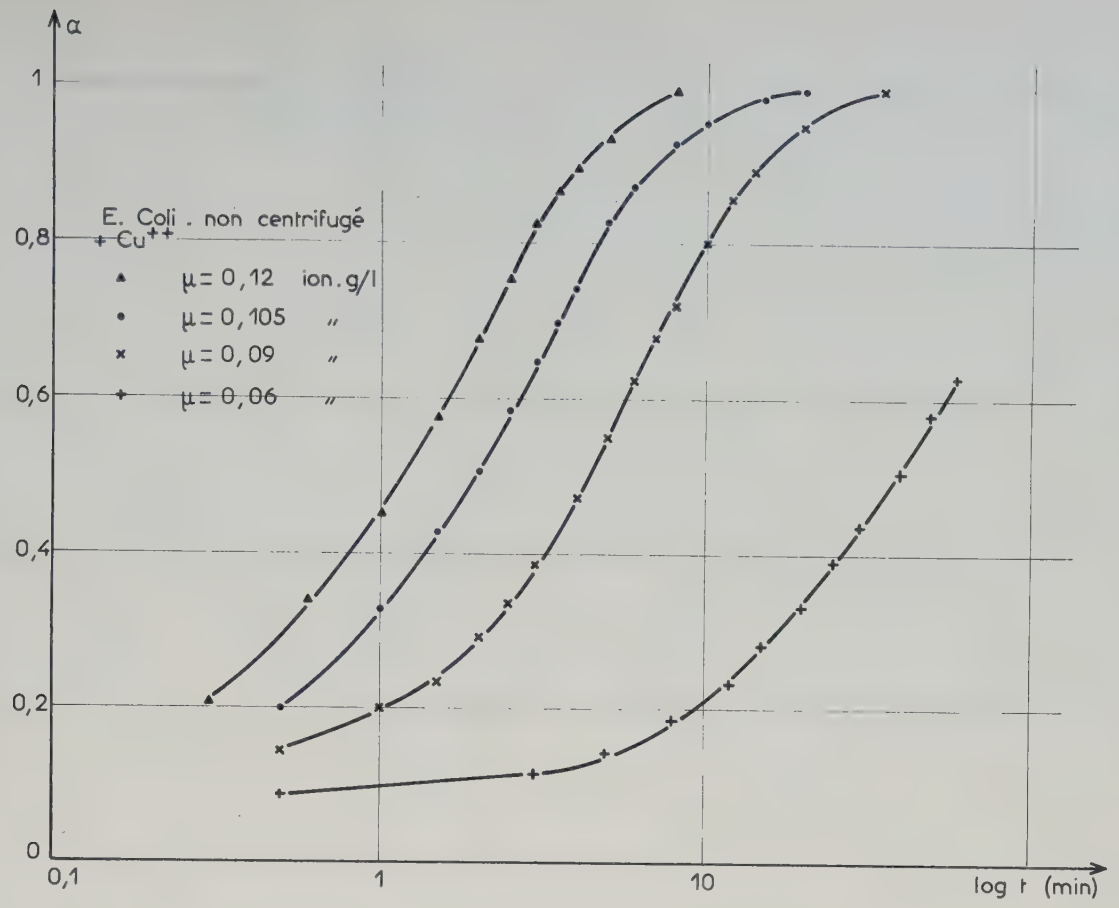

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
E. Coli . non centrifugé
+ Cu++
▲ μ = 0,12 ion.g/l
• μ = 0,105 "
× μ = 0,09 "
+ μ = 0,06 "
0,1
1
10
log t (min)

Fig. 33

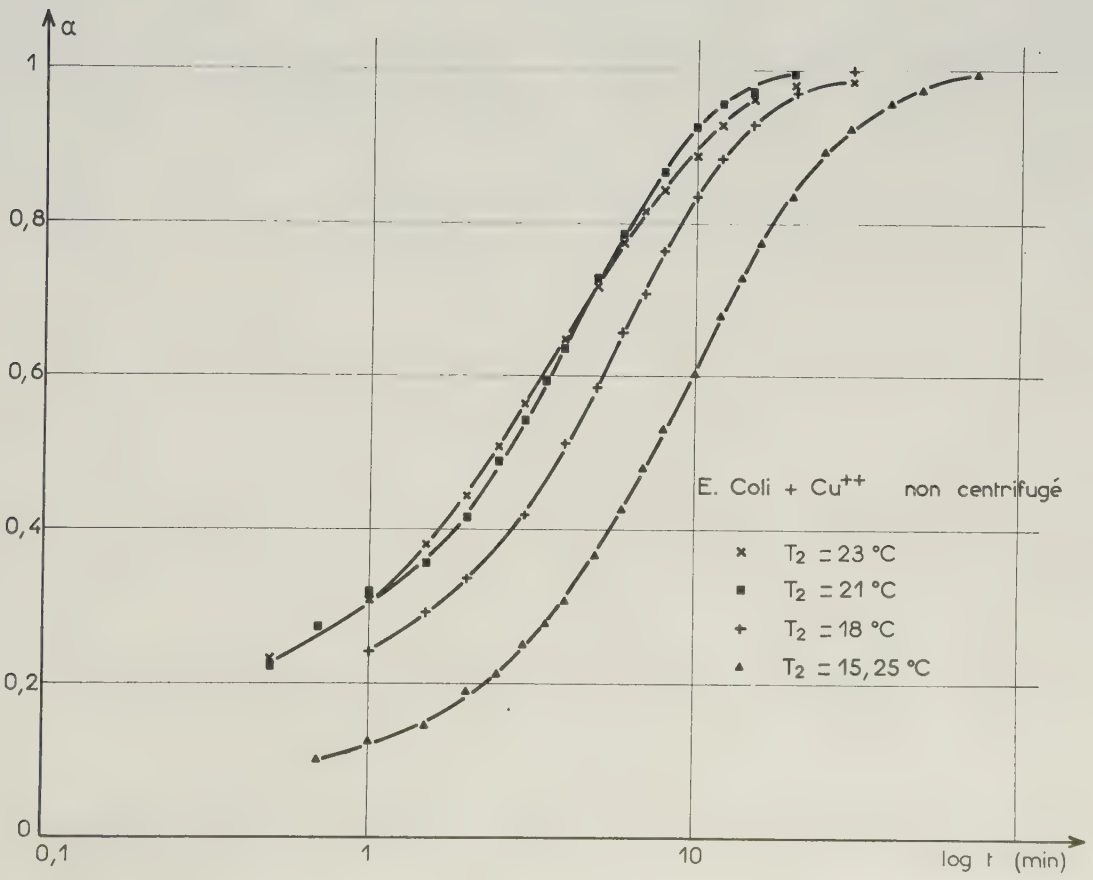

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
E. Coli + Cu++ non centrifugé
× T2 = 23 °C
■ T2 = 21 °C
+ T2 = 18 °C
▲ T2 = 15,25 °C
0,1
1
10
log t (min)

Fig. 34

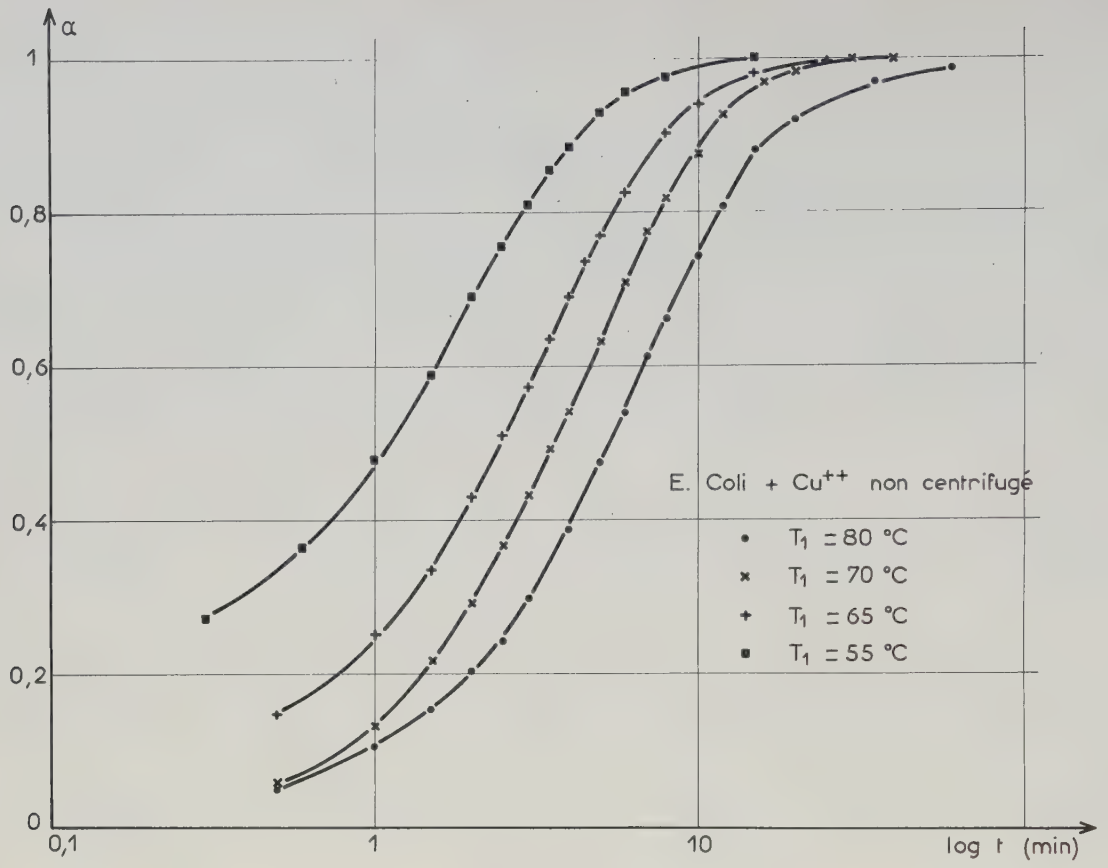

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
E. Coli + Cu++ non centrifugé
T1 = 80 °C
T1 = 70 °C
T1 = 65 °C
T1 = 55 °C

Fig. 35

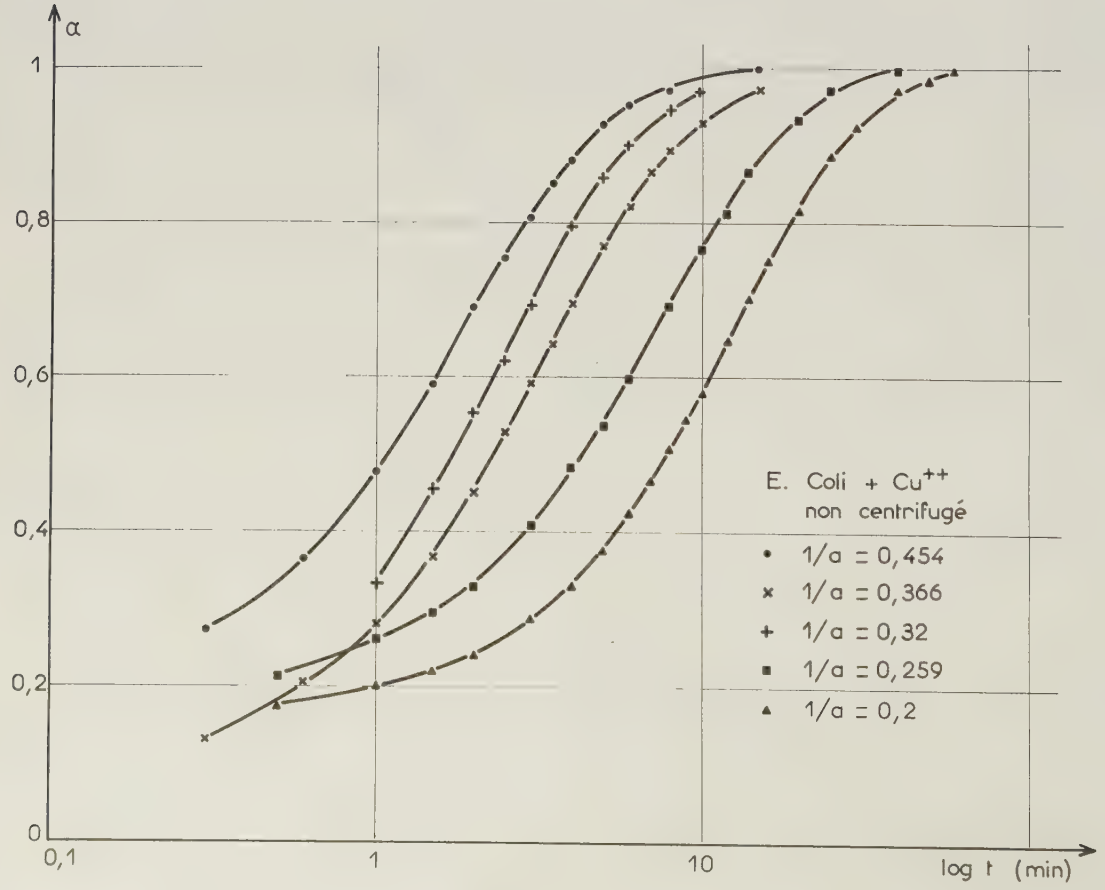

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
E. Coli + Cu++
non centrifugé
1/a = 0,454
1/a = 0,366
1/a = 0,32
1/a = 0,259
1/a = 0,2

Fig. 36

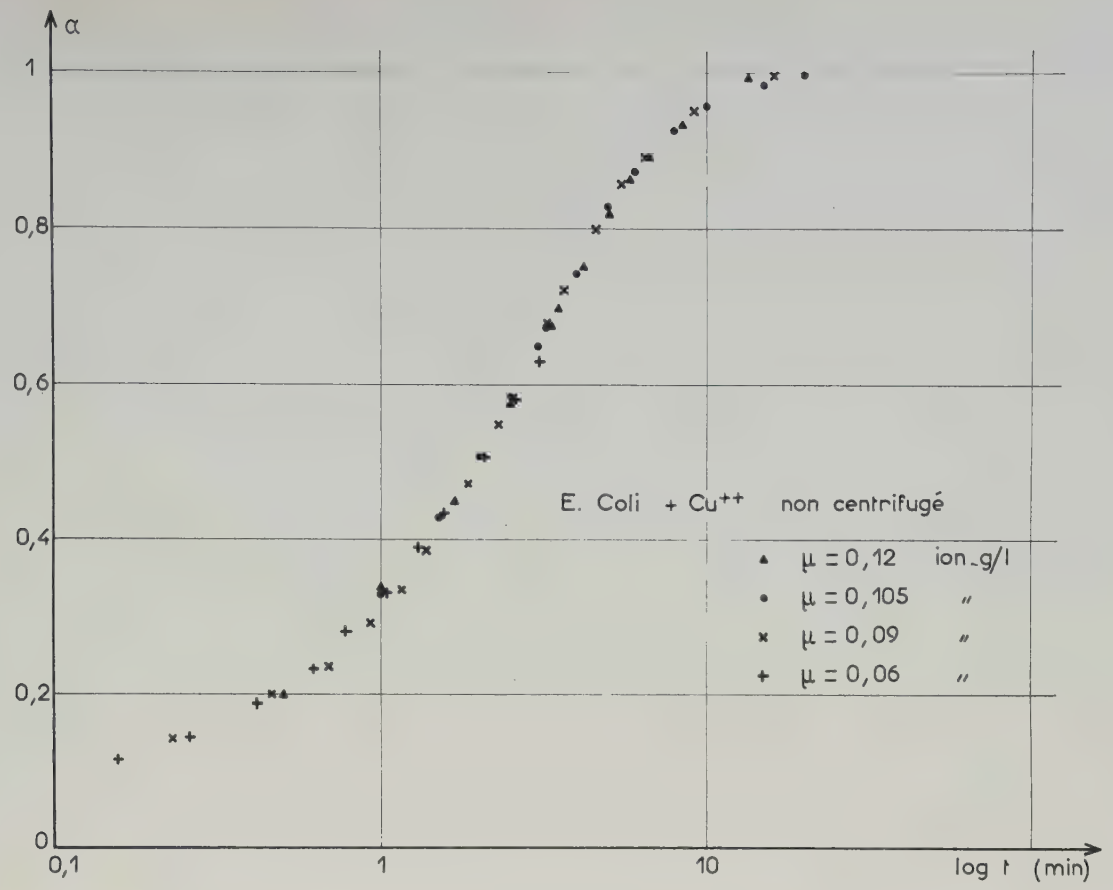

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
E. Coli + Cu++ non centrifugé
μ = 0,12 ion-g/l
μ = 0,105 "
μ = 0,09 "
μ = 0,06 "

Fig. 37

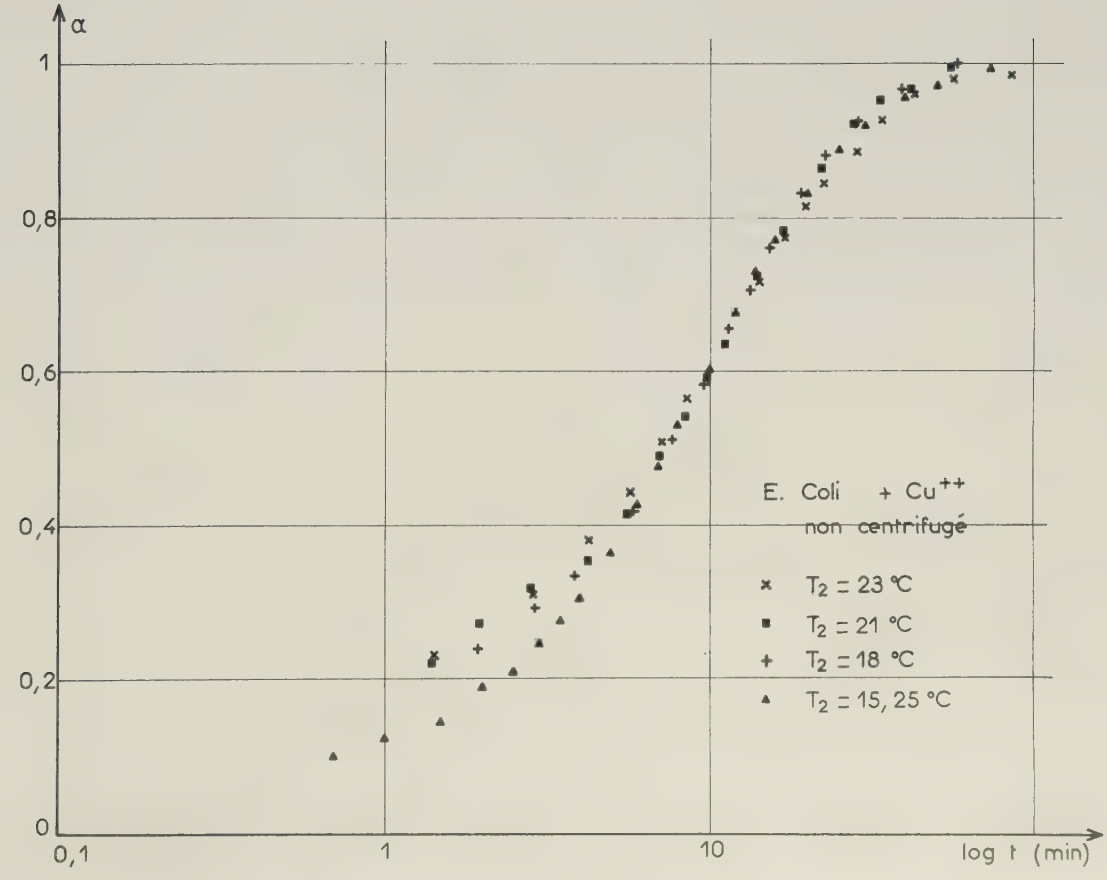

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
E. Coli + Cu++
non centrifugé
T2 = 23 °C
T2 = 21 °C
T2 = 18 °C
T2 = 15,25 °C

Fig. 38

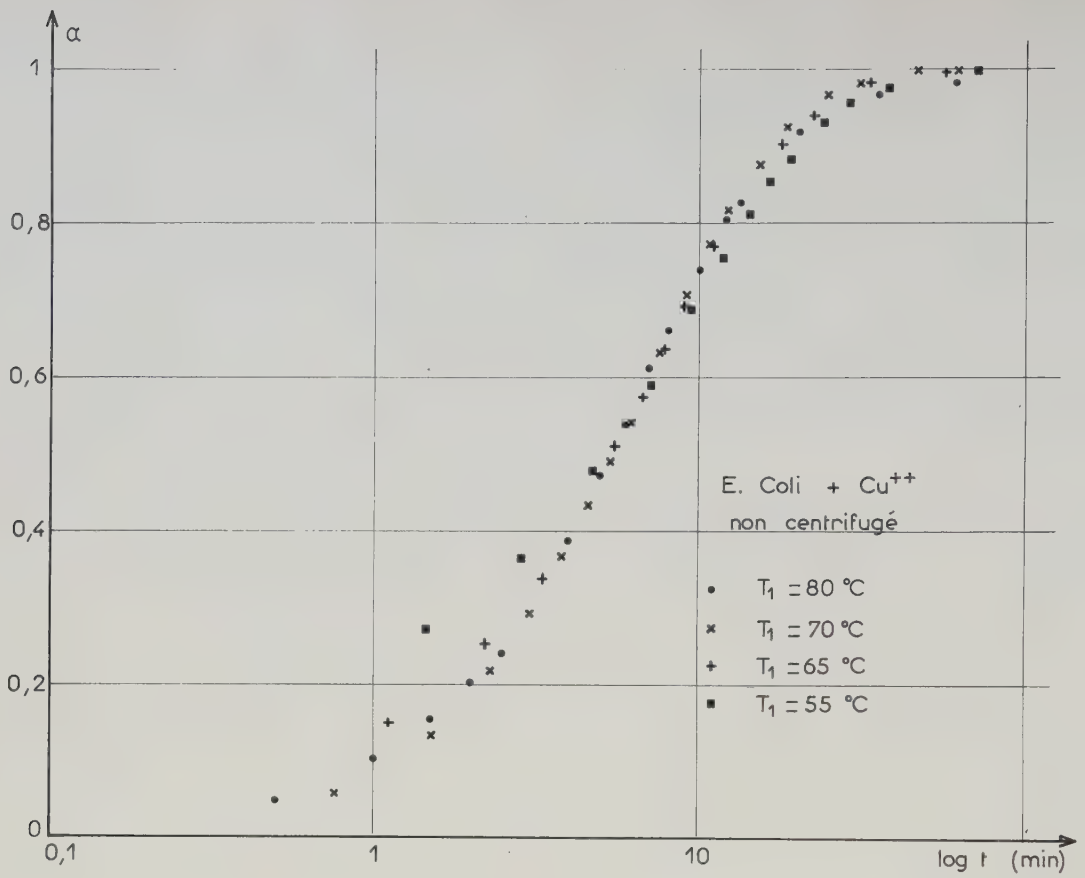

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
E. Coli + Cu++
non centrifugé
T1 = 80 °C
T1 = 70 °C
T1 = 65 °C
T1 = 55 °C

Fig. 39

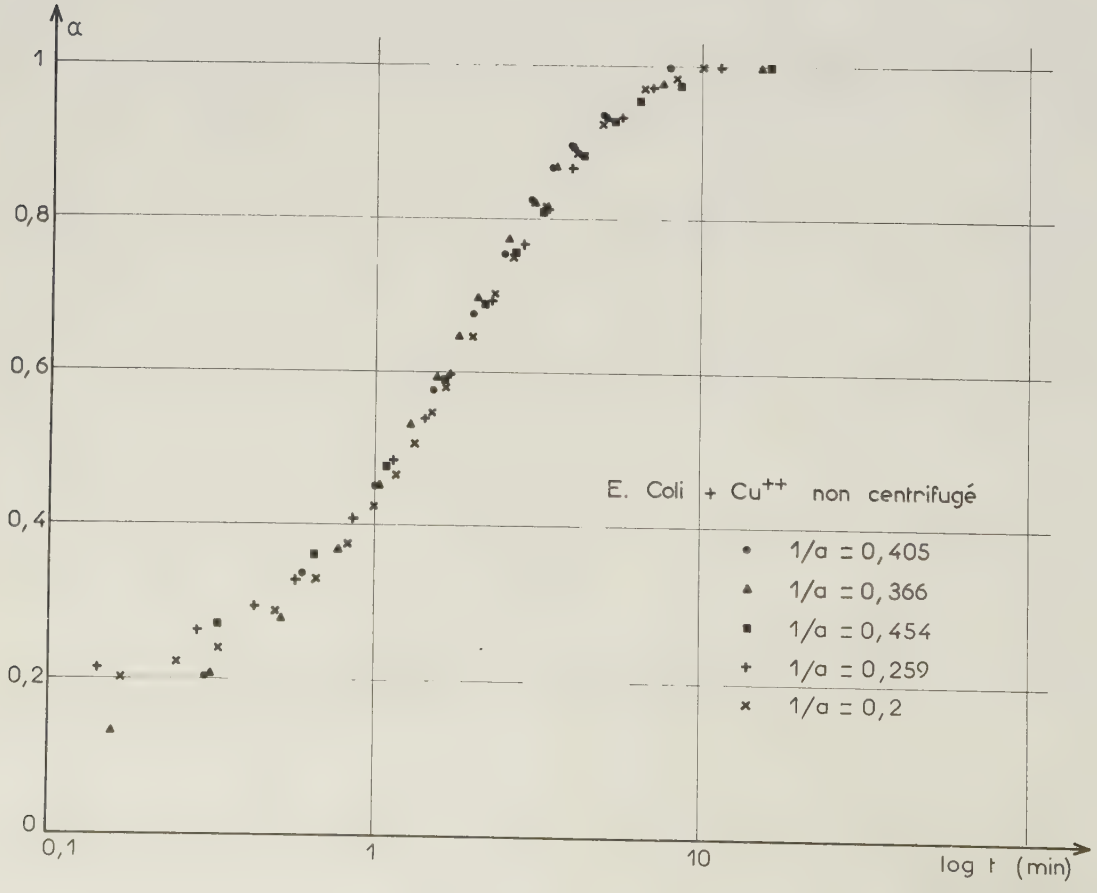

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
E. Coli + Cu++ non centrifugé
1/a = 0,405
1/a = 0,366
1/a = 0,454
1/a = 0,259
1/a = 0,2

Fig. 40

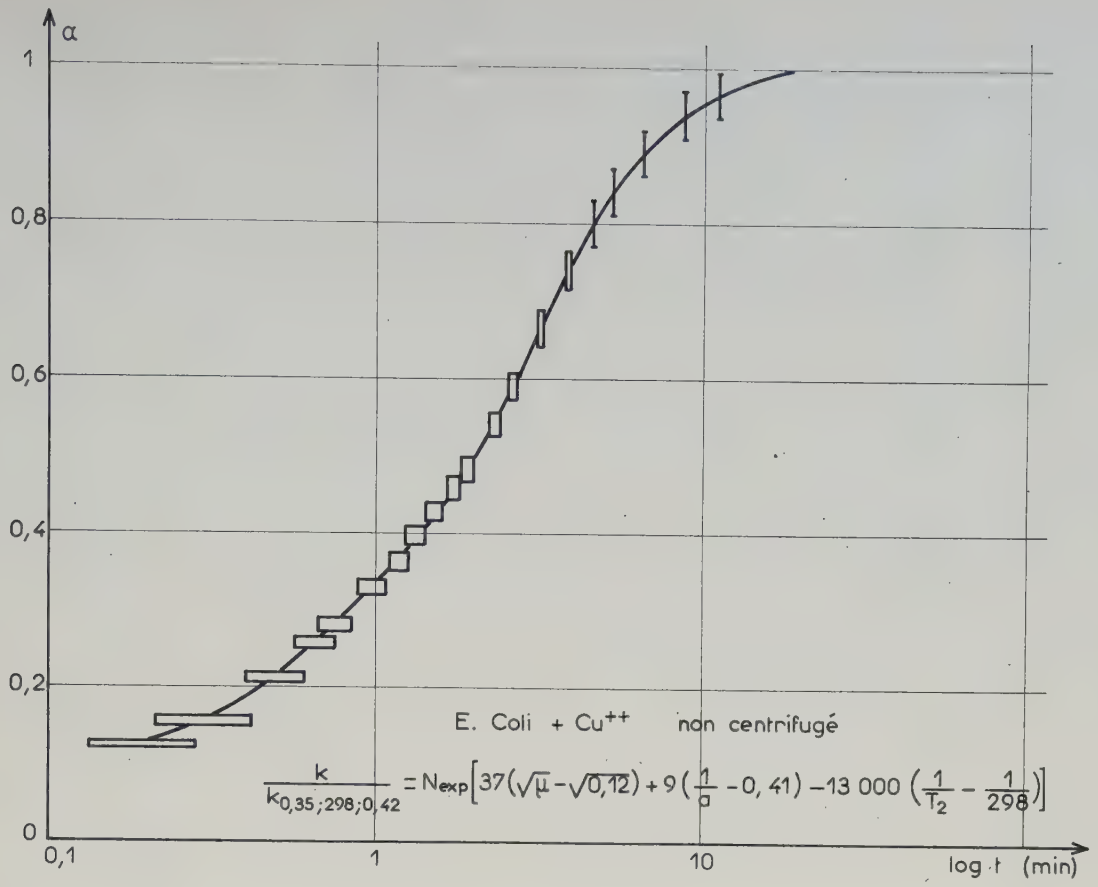

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
E. Coli + Cu++ non centrifugé
$\frac{k}{k_{0,35;298;0,42}} = N_{exp}\left[37(\sqrt{\mu}-\sqrt{0,12})+9\left(\frac{1}{\alpha}-0,41\right)-13\,000\left(\frac{1}{T_2}-\frac{1}{298}\right)\right]$

Fig. 41

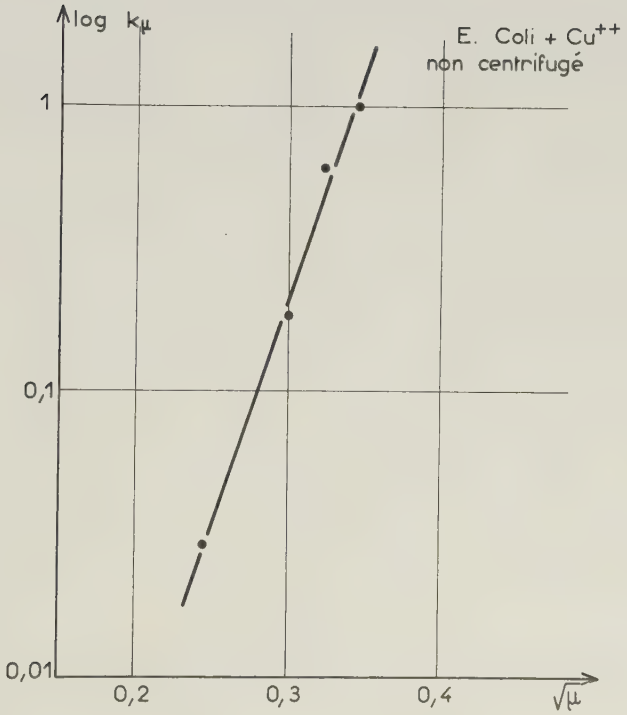

log kμ
E. Coli + Cu++
non centrifugé
1
0,1
0,01
0,2
0,3
0,4
√μ

Fig. 42

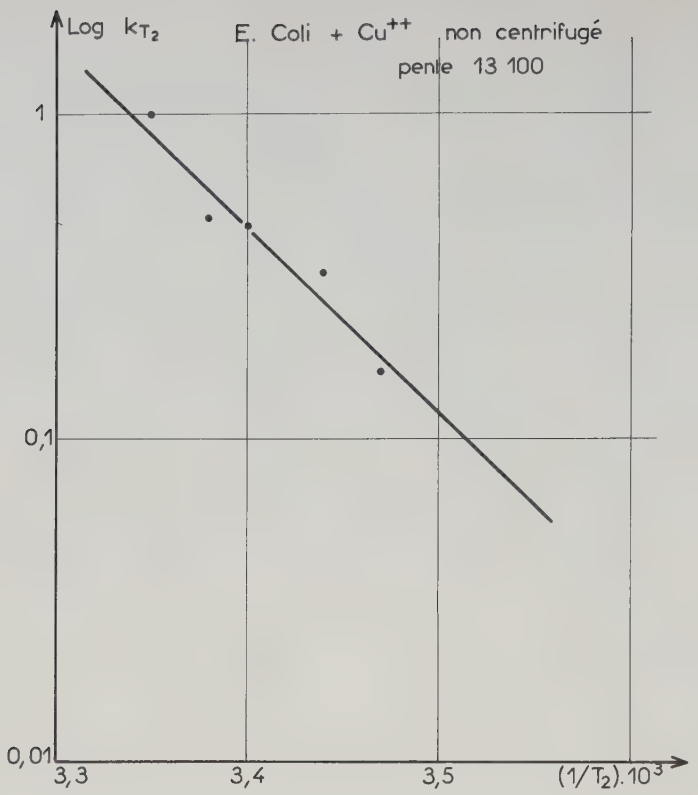

Log k_{T_2}
E. Coli + Cu^{++} non centrifugé
pente 13 100
1
0,1
0,01
3,3
3,4
3,5
$(1/T_2).10^3$

Fig. 43

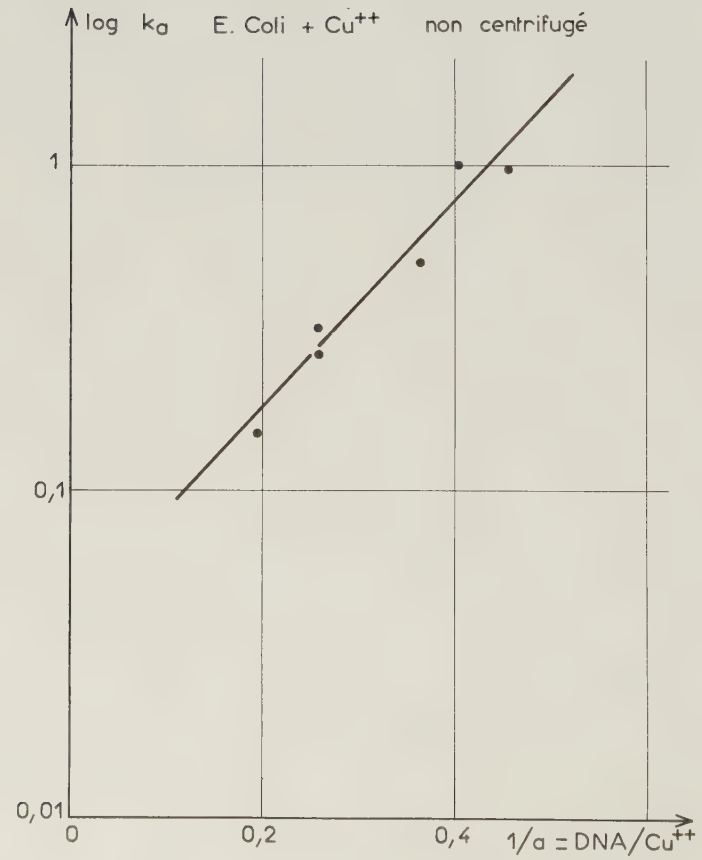

log k_a
E. Coli + Cu^{++} non centrifugé
1
0,1
0,01
0
0,2
0,4
$1/a = DNA/Cu^{++}$

Fig. 44

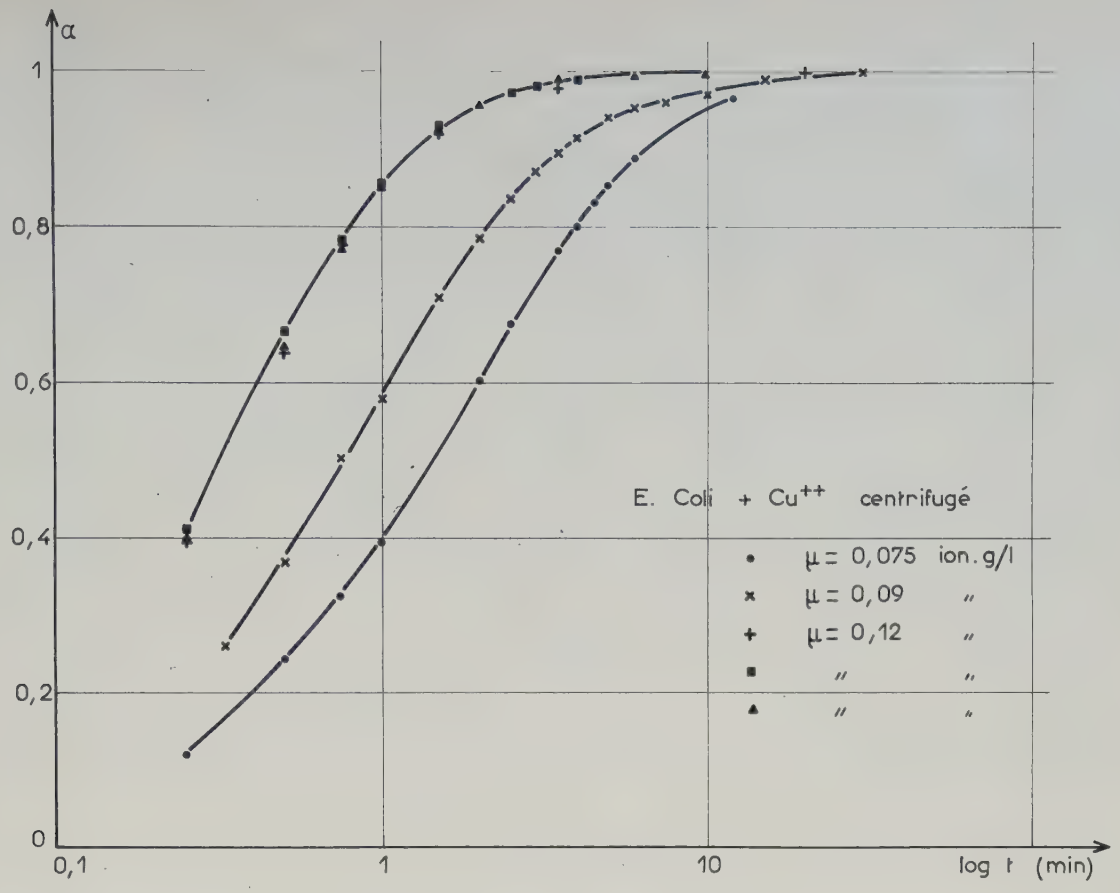

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
E. Coli + Cu++ centrifugé
• μ = 0,075 ion.g/l
× μ = 0,09 "
+ μ = 0,12 "
■ " "
▲ " "

Fig. 45

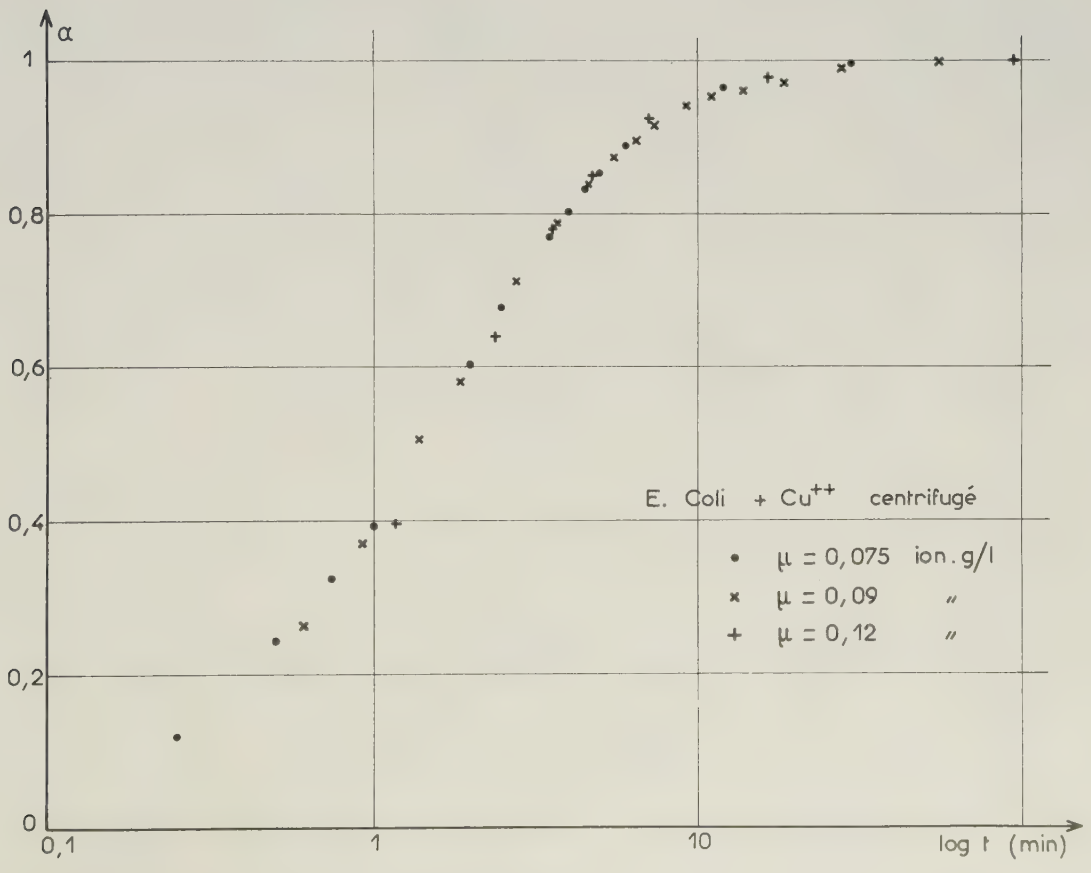

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
E. Coli + Cu++ centrifugé
• μ = 0,075 ion.g/l
× μ = 0,09 "
+ μ = 0,12 "

Fig. 46

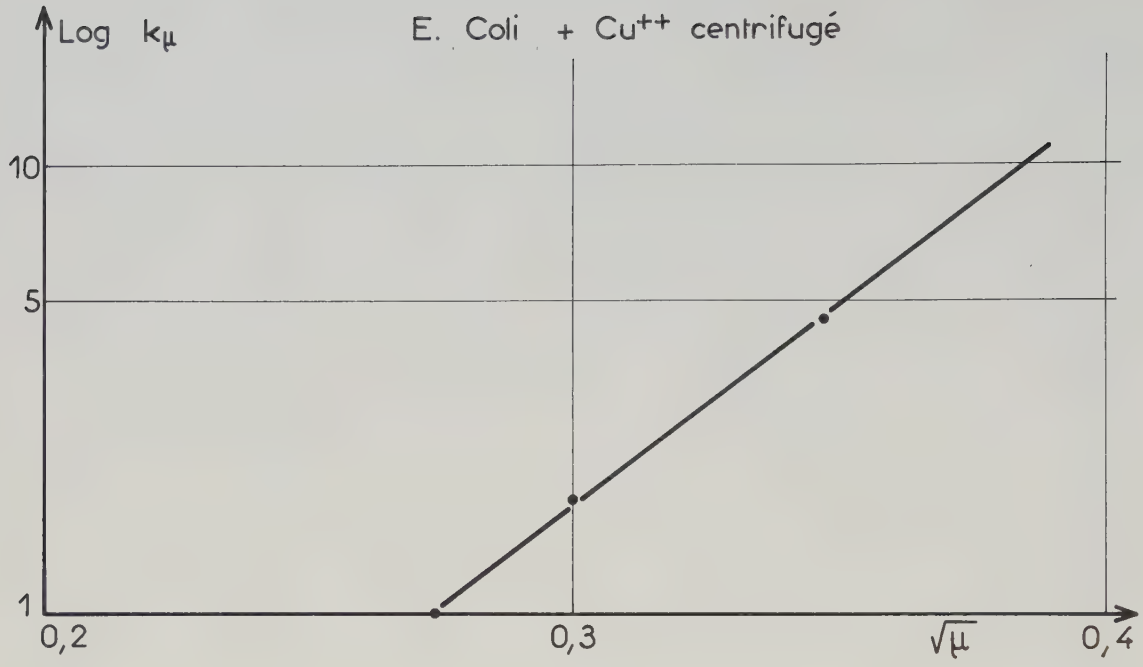

Log k_μ
E. Coli + Cu^{++} centrifugé
10
5
1
0,2
0,3
$\sqrt{\mu}$
0,4

Fig. 47

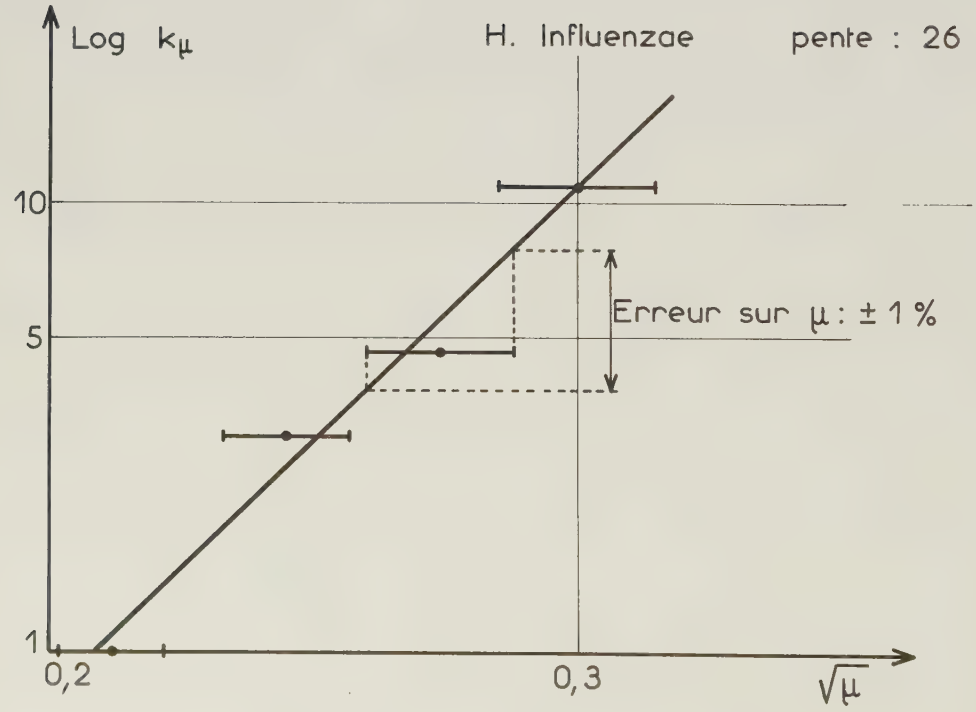

Log k_μ
H. Influenzae
pente : 26
10
5
1
Erreur sur μ : ± 1 %
0,2
0,3
$\sqrt{\mu}$

Fig. 50

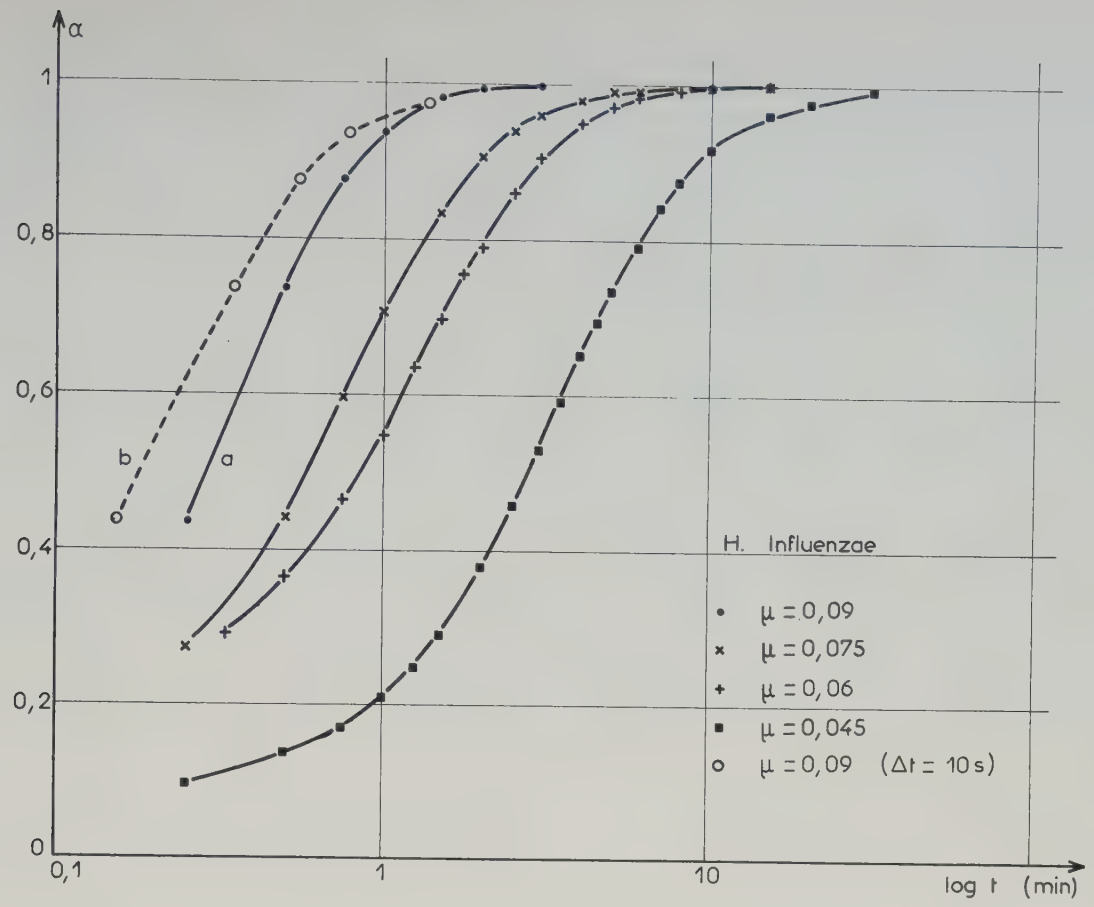

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
b
a
H. Influenzae
μ = 0,09
μ = 0,075
μ = 0,06
μ = 0,045
μ = 0,09 (Δt = 10 s)

Fig. 48

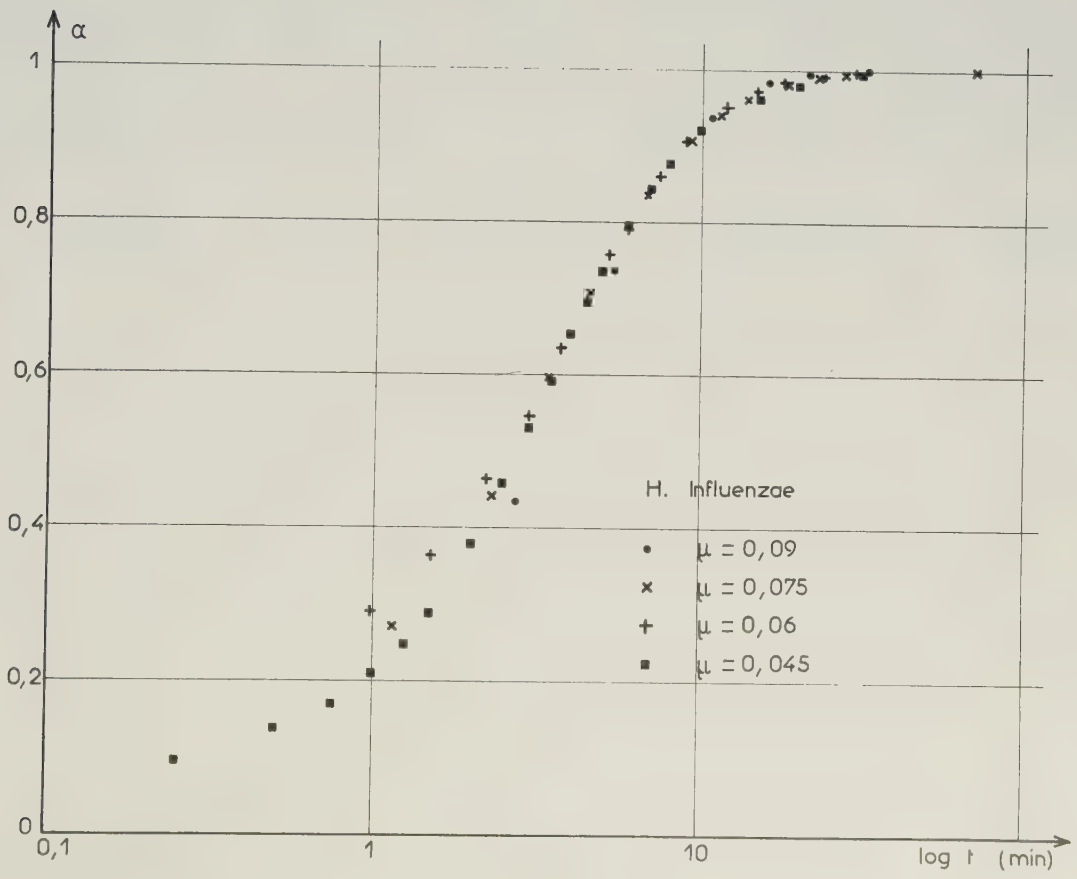

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
H. Influenzae
μ = 0,09
μ = 0,075
μ = 0,06
μ = 0,045

Fig. 49

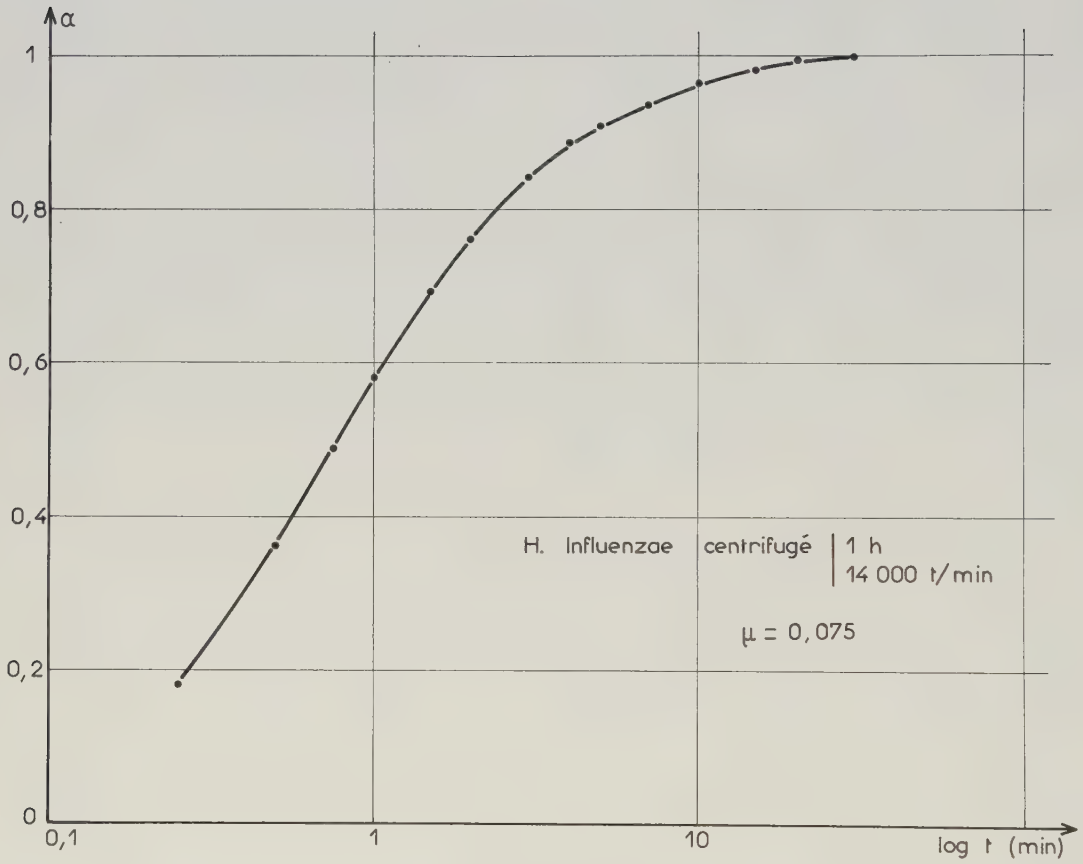

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
H. Influenzae centrifugé
1 h
14 000 t/min
μ = 0,075

Fig. 51

H. Influenzae + Cu^{++} centrifugé 1h, 14000 t/min Cary 16 | $\mu = 0,075$ ($T_2 = 25°$ C ; a = 2,5 ; $T_1 = 55°$ C)

Le principe de l'obtention d'une courbe "unique" relative à l'évolution d'un système donné ayant été vérifié en étudiant plusieurs systèmes différents, nous n'avons effectué qu'une "renaturation" du système précédent : la courbe obtenue est l'image de sa courbe "unique" et on peut la comparer aux courbes "uniques" des autres systèmes (fig. 51).

V 309 + Zn^{++} non centrifugé Cary 14 (31) |
- Δ = 5 ; 10 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 ; 120 min ($T_2 = 25°$ C ; $T_1 = 80°$ C ; $\mu' = 5.10^{-3}$ ion-g/l ; b = 10)
- T_2 = 16 ; 20,5 ; 25 ; 28 ; 30 ; 35° C (Δ = 30 min ; $T_1 = 80°$ C ; $\mu' = 5.10^{-3}$ ion-g/l ; b = 10)

Les courbes relatives à ces cinétiques sont portées sur les fig.(52, 53), (54, 55).

E. Coli 304 + Zn^{++}, non centrifugé Cary 14 (31) |
- μ' = 4.10^{-3} ; 5.10^{-3} ; $6,7.10^{-3}$; 8.10^{-3} ; 10^{-2} ion-g/l ($T_2 = 25°$ C $T_1 = 80°$ C ; Δ = 30 min ; b = 10)
- Δ = 5 ; 10 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 ; 120 min ($T_2 = 25°$ C ; $T_1 = 80°$ C ; $\mu' = 5.10^{-3}$ ion-g/l ; b = 10)
- T_1 = 70 ; 80 ; 90° C ($T_2 = 25°$ C ; Δ = 30 min ; $\mu' = 5.10^{-3}$ ion-g/l ; b = 10)

Les courbes relatives à ces cinétiques sont portées sur les fig.(56, 57, 58) (59, 60, 61).

Les courbes "uniques" correspondantes sont groupées sur la fig.(62).

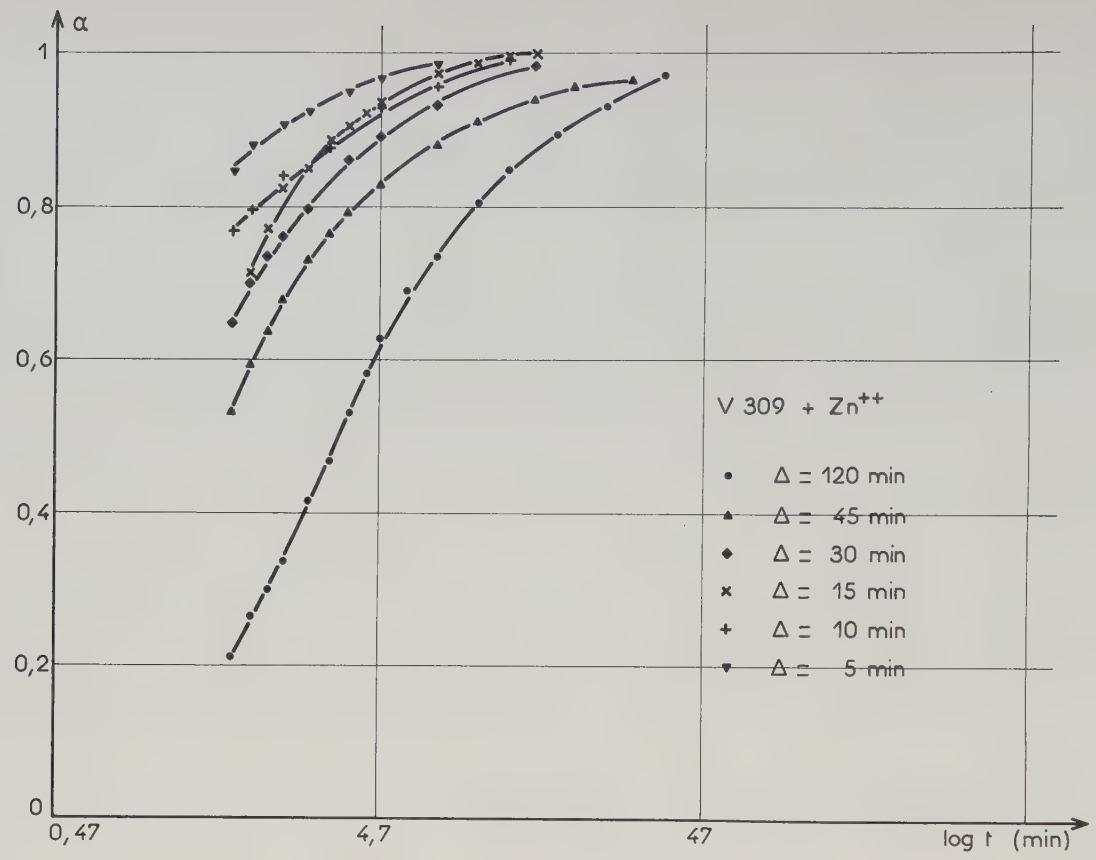

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
V 309 + Zn++
Δ = 120 min
Δ = 45 min
Δ = 30 min
Δ = 15 min
Δ = 10 min
Δ = 5 min

Fig. 52

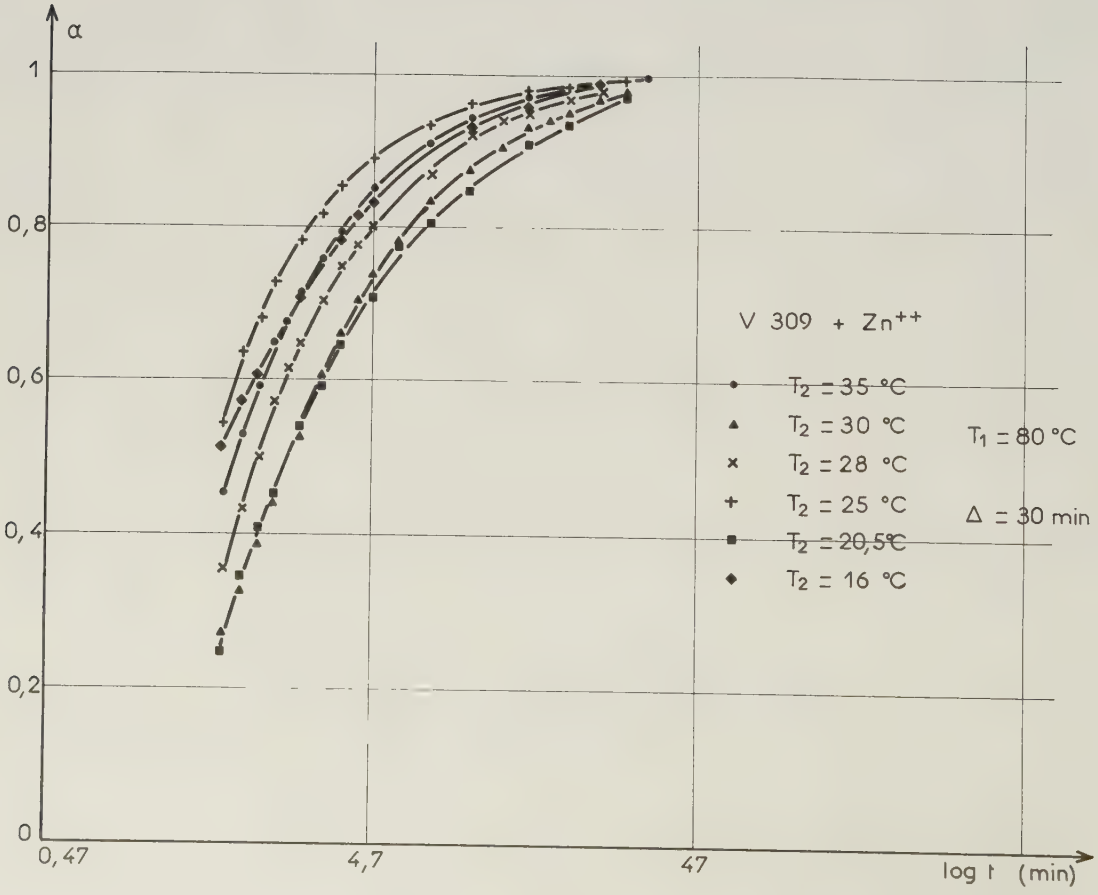

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
V 309 + Zn++
T2 = 35 °C
T2 = 30 °C
T2 = 28 °C
T2 = 25 °C
T2 = 20,5°C
T2 = 16 °C
T1 = 80 °C
Δ = 30 min

Fig. 53

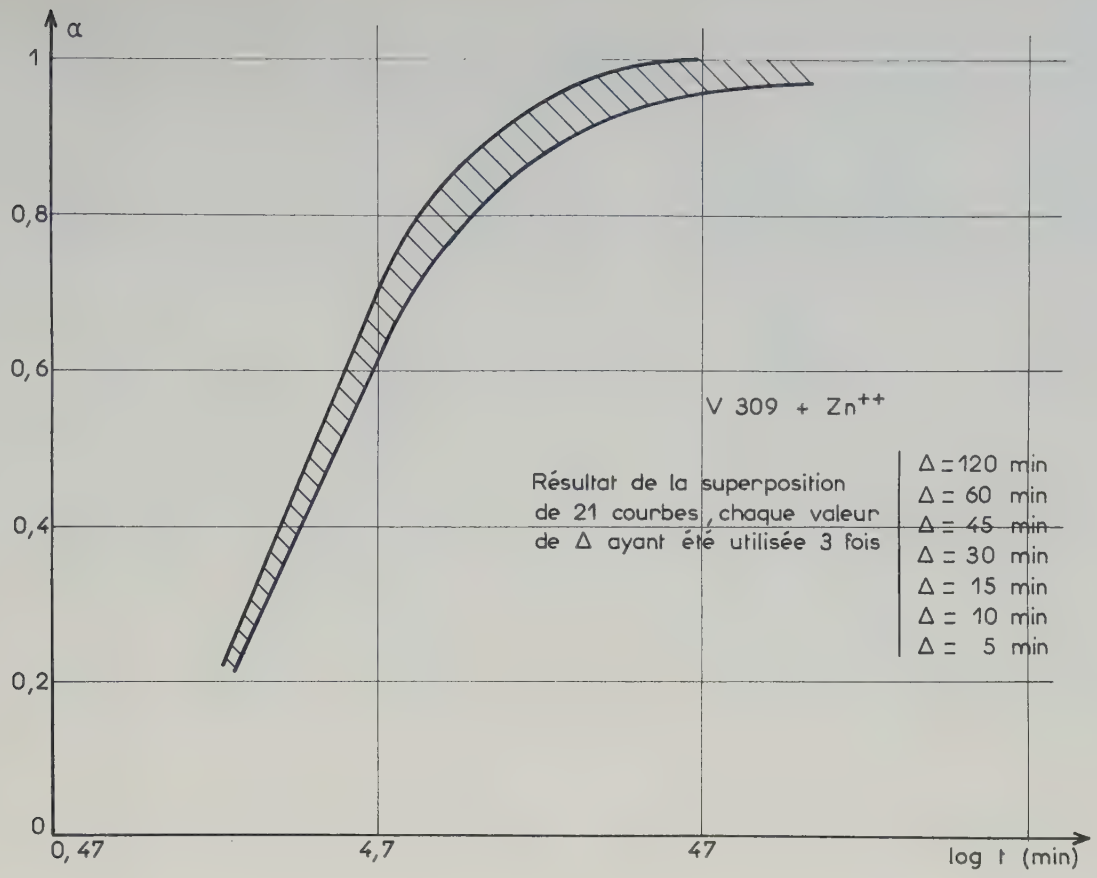

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
V 309 + Zn++
Résultat de la superposition de 21 courbes, chaque valeur de Δ ayant été utilisée 3 fois
Δ = 120 min
Δ = 60 min
Δ = 45 min
Δ = 30 min
Δ = 15 min
Δ = 10 min
Δ = 5 min

Fig. 54

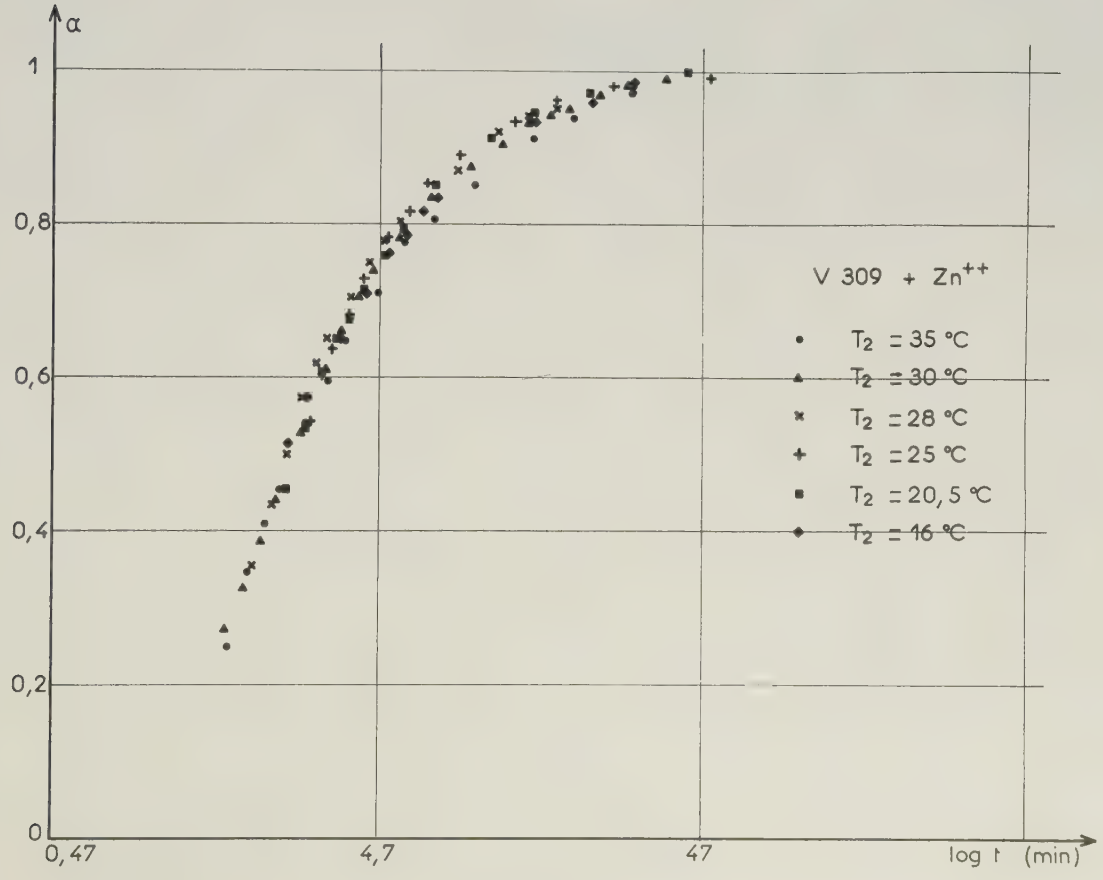

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
V 309 + Zn++
T2 = 35 °C
T2 = 30 °C
T2 = 28 °C
T2 = 25 °C
T2 = 20,5 °C
T2 = 16 °C

Fig. 55

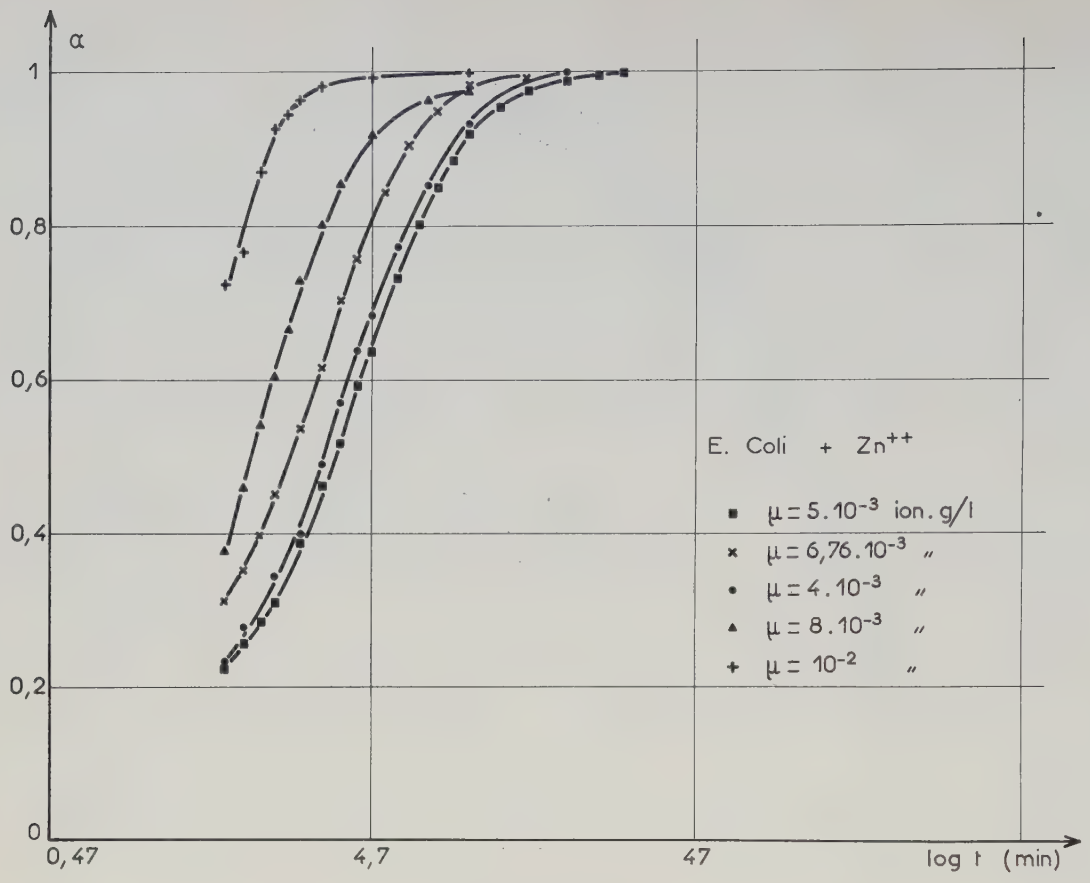

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
E. Coli + Zn++
μ = 5.10-3 ion. g/l
μ = 6,76.10-3 "
μ = 4.10-3 "
μ = 8.10-3 "
μ = 10-2 "

Fig. 56

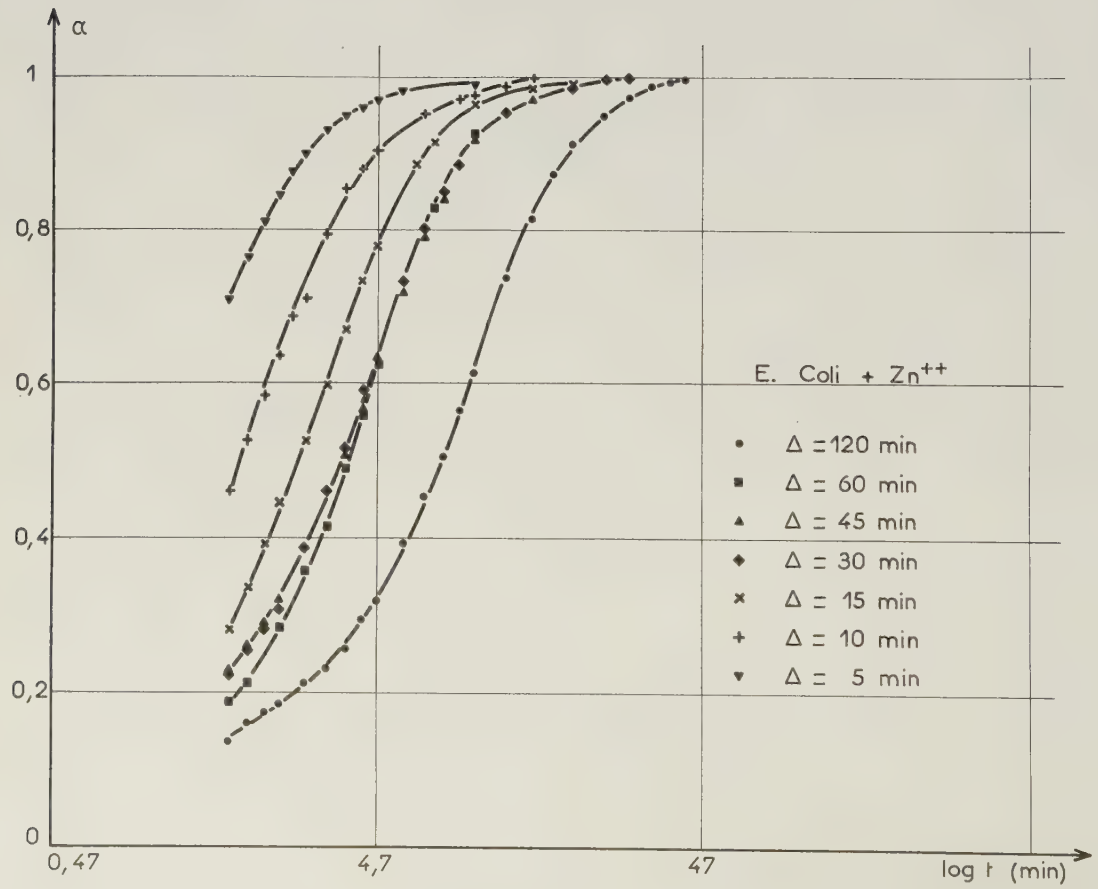

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
E. Coli + Zn++
Δ = 120 min
Δ = 60 min
Δ = 45 min
Δ = 30 min
Δ = 15 min
Δ = 10 min
Δ = 5 min

Fig. 57

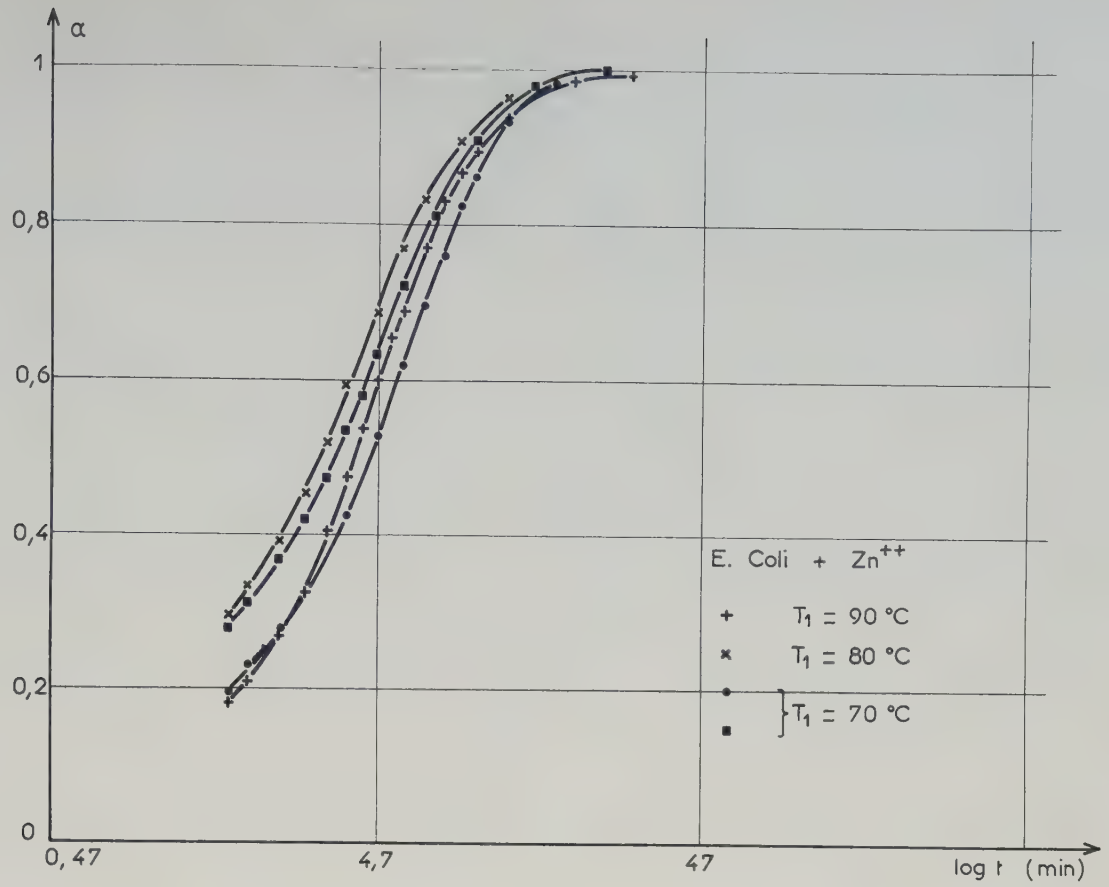

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
E. Coli + Zn++
T1 = 90 °C
T1 = 80 °C
T1 = 70 °C

Fig. 58

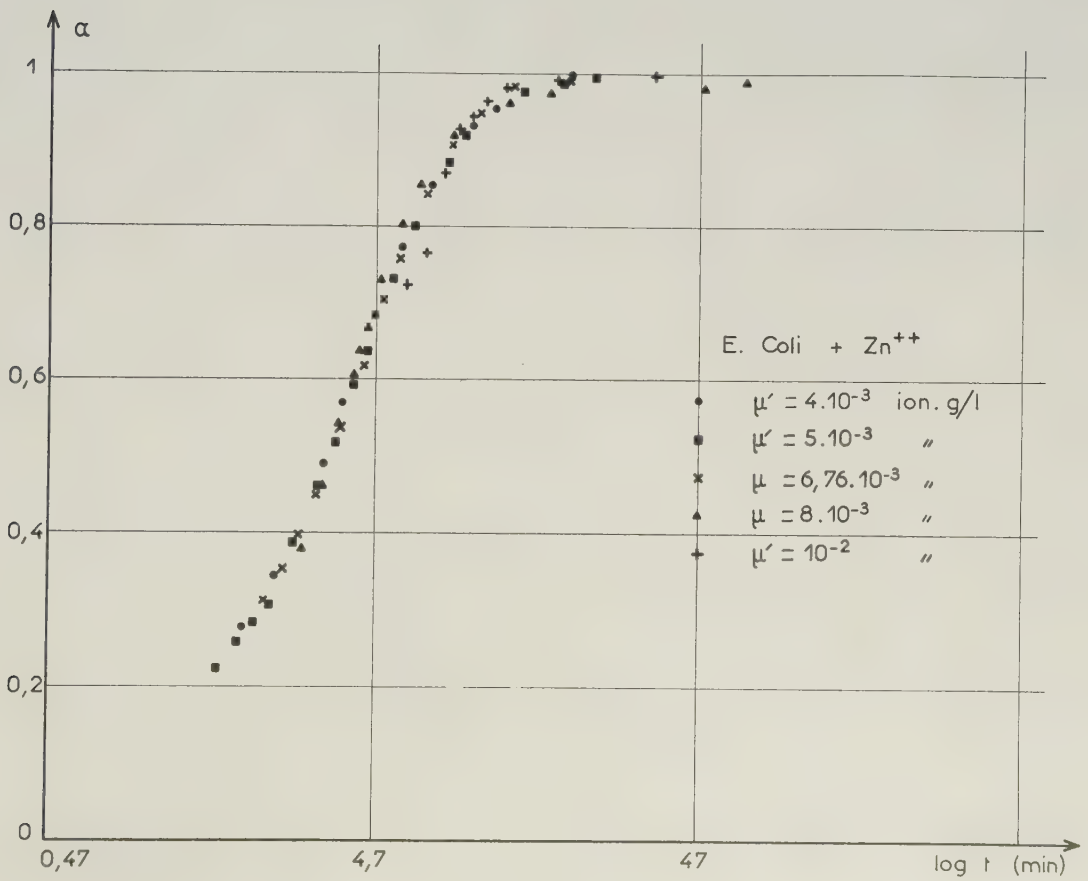

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
E. Coli + Zn++
μ' = 4.10-3 ion. g/l
μ' = 5.10-3 "
μ = 6,76.10-3 "
μ = 8.10-3 "
μ' = 10-2 "

Fig. 59

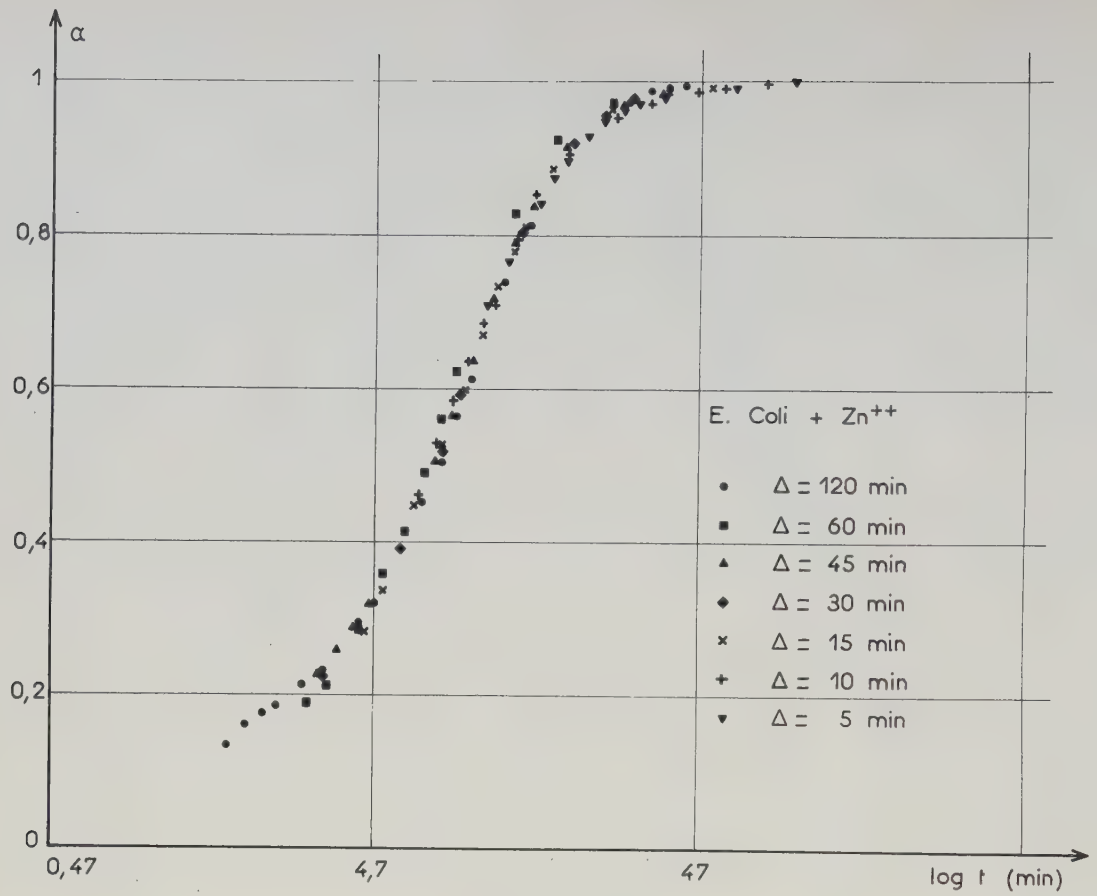

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
E. Coli + Zn++
Δ = 120 min
Δ = 60 min
Δ = 45 min
Δ = 30 min
Δ = 15 min
Δ = 10 min
Δ = 5 min

Fig. 60

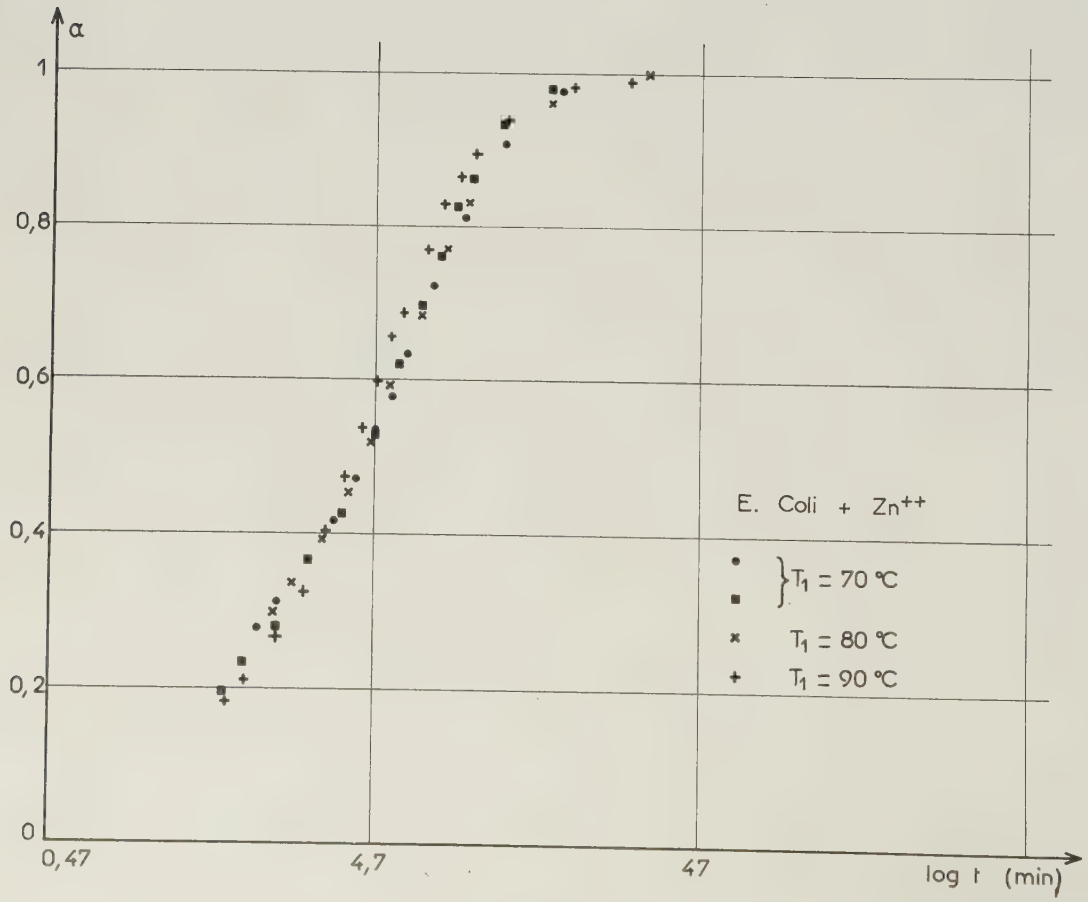

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
E. Coli + Zn++
T1 = 70 °C
T1 = 80 °C
T1 = 90 °C

Fig. 61

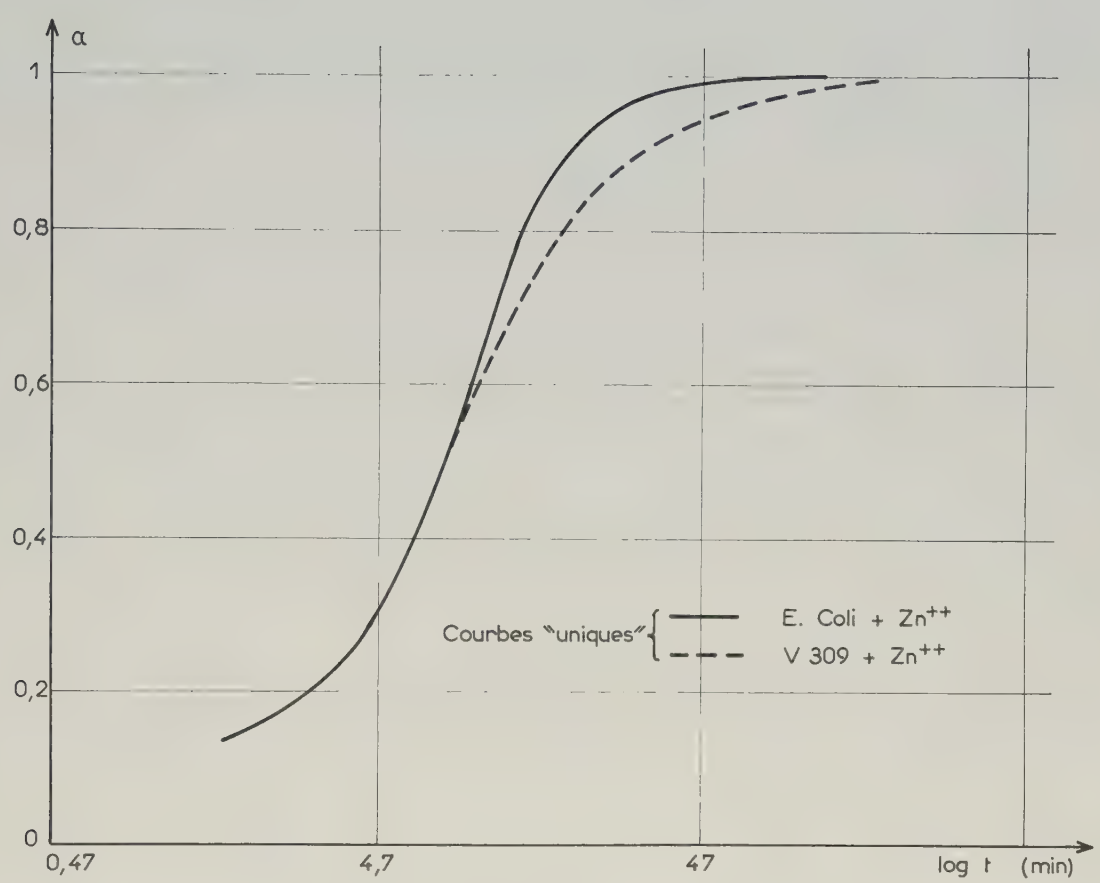

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,47
4,7
47
log t (min)
Courbes "uniques"
E. Coli + Zn++
V 309 + Zn++

Fig. 62

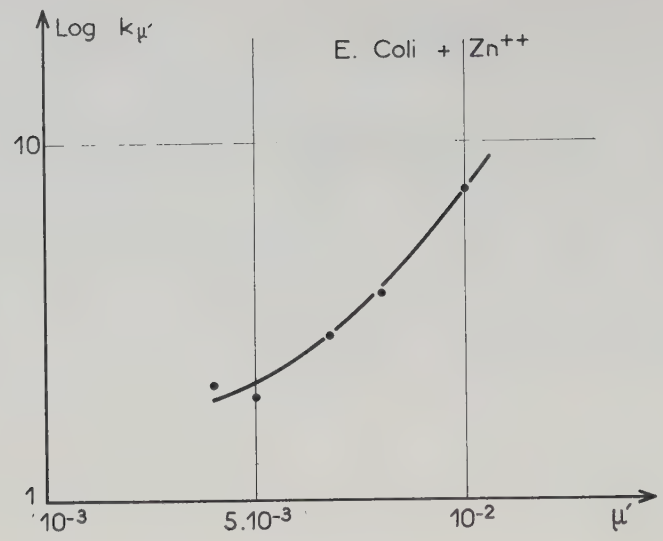


Fig. 63

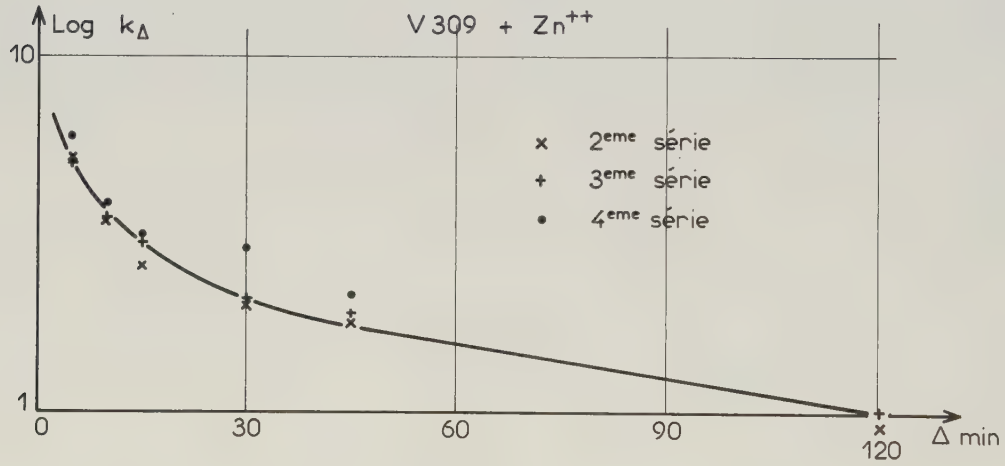


Fig. 64

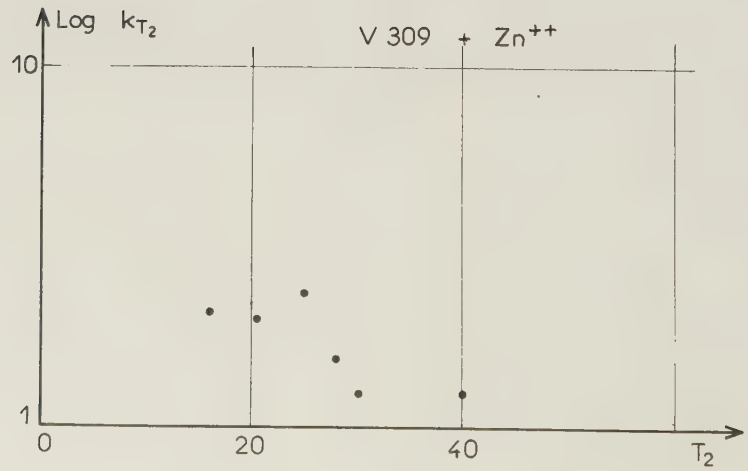


Fig. 65

Les courbes Log k_{p_i} = $f(p_i)$ n'ayant pas pu être paramétrées suivant des lois simples, donner une équation serait sans signification. Nous indiquerons seulement que la vitesse de "renaturation"

- est une fonction croissante de μ' (fig.63)
- est une fonction décroissante du temps Δ (fig.64) et du rapport b
- dépend peu de T_1 et T_2 (fig.65) dans les domaines de température étudiés.

3) UTILISATION D'UNE AUTRE PROPRIETE :

DOSAGE DES IONS Cu^{++}

AU COURS DE LA "RENATURATION" DU DNA

Ce dosage étant fait par voie électrochimique, la propriété connue au cours de la "renaturation" est le potentiel de l'électrode de mesure E par rapport à une électrode de référence. Ce potentiel E est donné par :

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{2\mathcal{F}} \text{Log } (\gamma c_{Cu^{++}})$$

Connaissant : $E = f(t)$

$E_1 = f(t_o)$ à l'instant initial

$E_2 = f(t_{final})$ à la fin de la réaction

Utilisant la règle phénoménologique (Ch. I-1), nous déterminons le degré d'évolution α en fonction de log t, t étant le temps écoulé à partir du début de la transformation. Les courbes $\alpha = \psi(\log t)$ représentant l'évolution des ions Cu^{++} sont à comparer aux courbes $\alpha = \psi(\log t)$ correspondant à l'évolution du DNA, leur comparaison pouvant en effet donner des indications au sujet du mécanisme.

Le degré d'évolution mesuré par le dosage des ions Cu^{++} est en fonction de l'activité :

$$\alpha = \frac{(\gamma c_{Cu^{++}}) - (\gamma c_{Cu^{++}})_1}{(\gamma c_{Cu^{++}})_2 - (\gamma c_{Cu^{++}})_1} = \frac{(\gamma c_{Cu^{++}})/(\gamma c_{Cu^{++}})_1 - 1}{(\gamma c_{Cu^{++}})_2/(\gamma c_{Cu^{++}})_1 - 1} = \frac{[\exp (E-E_1)2\mathcal{F}/RT] - 1}{[\exp (E_2-E_1)2\mathcal{F}/RT] - 1}$$

La Fig. (65 bis) représente $\alpha = \psi(\log t)$ obtenue en "renaturant" du DNA de thymus de veau V 371 en présence d'ions Cu^{++} (a = 2), la force ionique valant $\mu = 0{,}09$ ion-g/l ($Na_2 SO_4$). Cette figure correspond à deux expériences effectuées dans les mêmes conditions (les valeurs des variables autres que μ et a caractérisant cette évolution sont données au Chapitre II-57).

Cette cinétique est assez lente pour qu'une portion assez grande de courbe puisse être tracée et comparée aux courbes d'évolution du DNA. Mais elle est aussi assez rapide pour que la transformation soit finie au bout de 30 minutes, ce qui est préférable pour déterminer la limite E_2 en fin de transformation

avant qu'une trop grande quantité de NaCl ne diffuse de l'électrode de référence vers la solution cuivrique de DNA étudiée (Ch. II-57) (Ch. III-44).

Conséquences :

- La "renaturation" du DNA s'accompagne de l'augmentation de la concentration en ions Cu^{++} libres.
- La vitesse de cette transformation croît avec la force ionique de "renaturation" μ : comme on l'a observé qualitativement*.

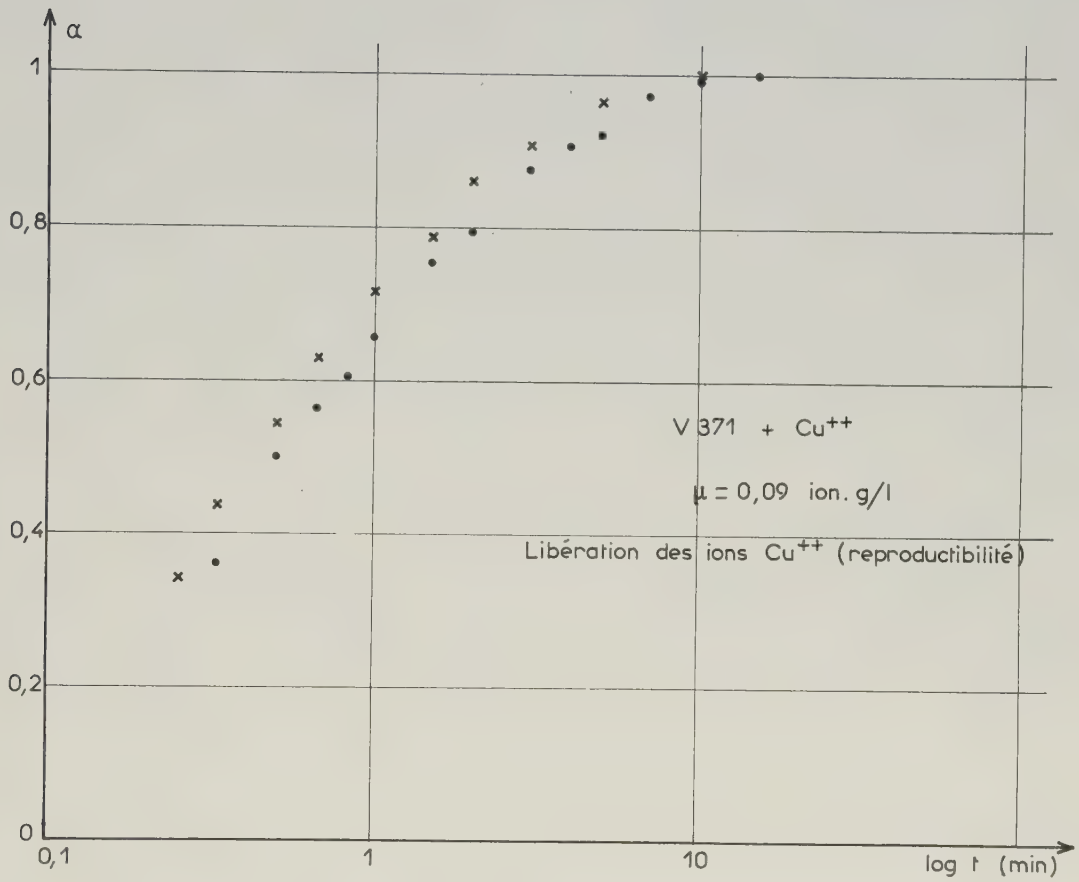


Fig. 65 bis

*Si $\mu \sim 0,12$ la vitesse est trop grande pour qu'il soit possible de tracer une portion appréciable de courbe $\alpha = \varphi$ (log t).

4) *PRECISION ET REPRODUCTIBILITE DES MESURES*

Nous avons présenté (Ch III_1, 2) un grand nombre de courbes $\alpha = \psi(\log t)$ que nous avons groupées en plusieurs courbes "uniques". Le terme "unique" n'est justifié que si les écarts observés sont de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales.

41) *Erreurs entraînant une modification de la forme des courbes (solutions cuivriques).*

411) Erreur sur le degré d'évolution .

Cette grandeur est définie par $\alpha = \dfrac{d_1 - d}{d_1 - d_2}$ où :

- d est la densité optique lue sur l'enregistreur en fonction du temps
- d_2 est la valeur qu'atteint d en fin de transformation, ce que nous noterons $d_{2\ lim.}$
- d_1, densité optique de l'état initial, ne pouvant pas être lue sur la courbe d = f(t) enregistrée (ChII-541) est calculée à partir de $d_{2\ lim.}$:

$$d_{1\ calc.} = h.\ d_{2\ lim.}$$

Le rapport hyperchromique h est déterminé par la mesure de la densité optique d'_2 de l'état natif avant traitement dénaturant et celle de la densité optique d'_1 de l'état dénaturé (cette lecture peut être faite pendant l'attente θ).

Ainsi $h = \dfrac{d'_1}{d'_2}$ n'est pas entaché de l'erreur due à la dilution des solutions par addition de $Na_2\ SO_4$. C'est donc cette valeur de h qui est utilisée pour calculer

$$d_{1\ calc.} = \frac{d'_1}{d'_2}\ d_{2\ lim.}$$

Si nous écrivons alors :

$$\alpha = \frac{d_{1\ calc.} - d}{d_{1\ calc.} - d_{2\ lim.}}$$

$$\frac{\Delta\alpha}{\alpha} \leq \Delta d_{1\ calc.} \left(\frac{1}{d_{1\ calc.} - d} - \frac{1}{d_{1 calc.} - d_{2\ lim.}}\right)$$

$$+ \frac{\Delta d}{d_{1\ calc.} - d} + \frac{d_{2\ lim}}{d_{1\ calc.} - d_{2\ lim}}$$

Cette manière cohérente de calculer α ne met en jeu que la précision avec laquelle le spectrophotomètre détermine les densités optiques. La grandeur entachée de l'erreur la plus importante est $d_{1\ calc.}$ car on la calcule de façon telle que :

$$\frac{\Delta d_{1\ calc.}}{d_{1\ calc.}} \leq \frac{\Delta d'_1}{d'_1} + \frac{\Delta d'_2}{d'_2} + \frac{\Delta d_{2\ lim.}}{d_{2\ lim.}}$$

L'erreur relative sur α a été évaluée à environ 8 % avec le Cary 14 et environ 4 % avec le Cary 16 (tableau IV).

(12) Erreur sur la détermination de l'origine de l'échelle des temps.

Puisque le mélange des solutions de $Na_2\ SO_4$ et de DNA n'est pas instantané, le temps au bout duquel la densité optique d est lue n'est pas t mais $t + \Delta t$, t étant la durée du mélange. Si on portait $\alpha = \psi\ (t)$ ceci se traduirait par une simple translation des courbes parallèlement à l'axe des abscisses. Il n'en est pas de même lorsqu'on trace $\alpha = \psi\ (\log t)$ sur une échelle logarithmique : sur une telle échelle, le décalage Δt n'est pas représenté par la même amplitude tout le long de l'axe des abscisses. La fig 48 représentant les cinétiques de "renaturation" de DNA de H. Influenzae pour plusieurs valeurs de la force ionique, μ illustre bien ceci. En effet, la courbe (b) est construite à partir de la courbe expérimentale (a) en décalant tous les points de 10 s, durée du mélange des solutions. La courbe (a) est difficilement superposable aux autres courbes de la même figure alors que la courbe (b) l'est de façon satisfaisante. On voit ainsi qu'une difficulté peut surgir si on porte t au lieu de $t + \Delta t$ puisque ceci se traduit graphiquement par un changement d'inclinaison des courbes $\alpha = \psi\ (\log t)$. A cause de l'échelle logarithmique, cet artefact est beaucoup plus accentué sur les "renaturations" rapides (1 ou 2 min) que sur les lentes ($\sim$ 30 min).

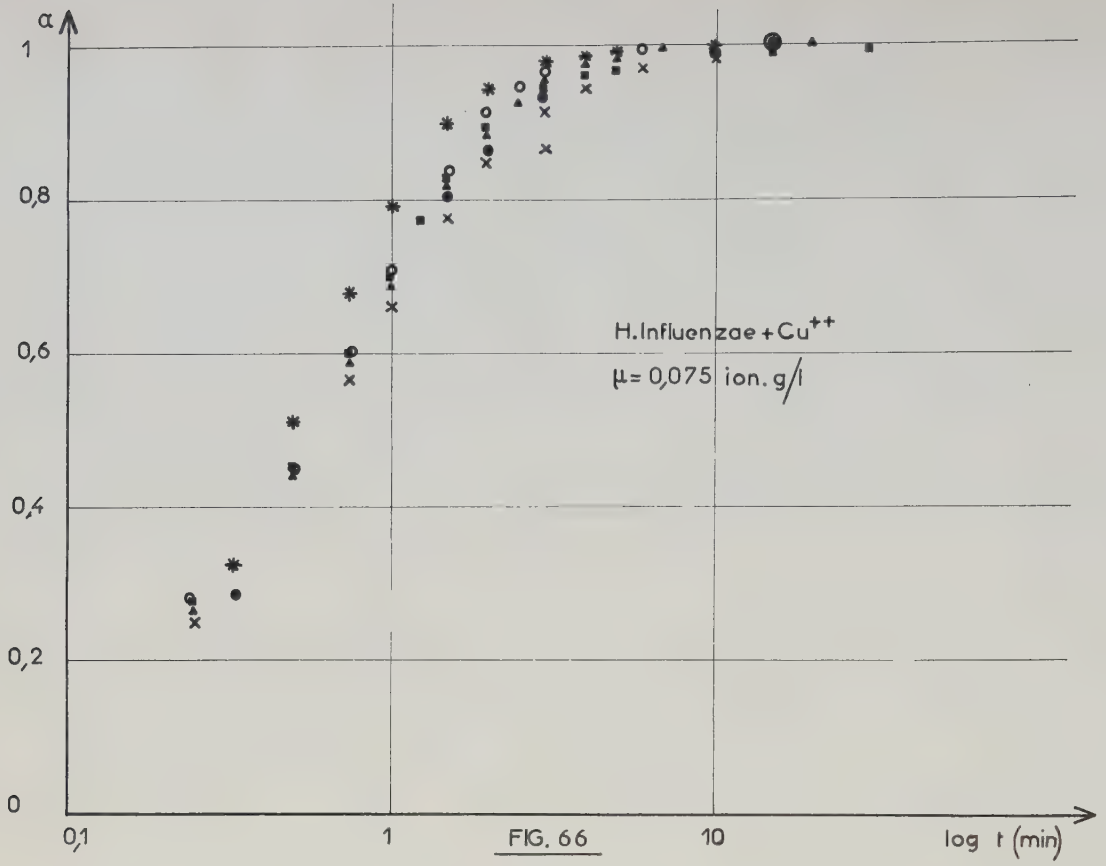

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
H. Influenzae + Cu++
μ = 0,075 ion. g/l
0,1
1
10
log t (min)

FIG. 66

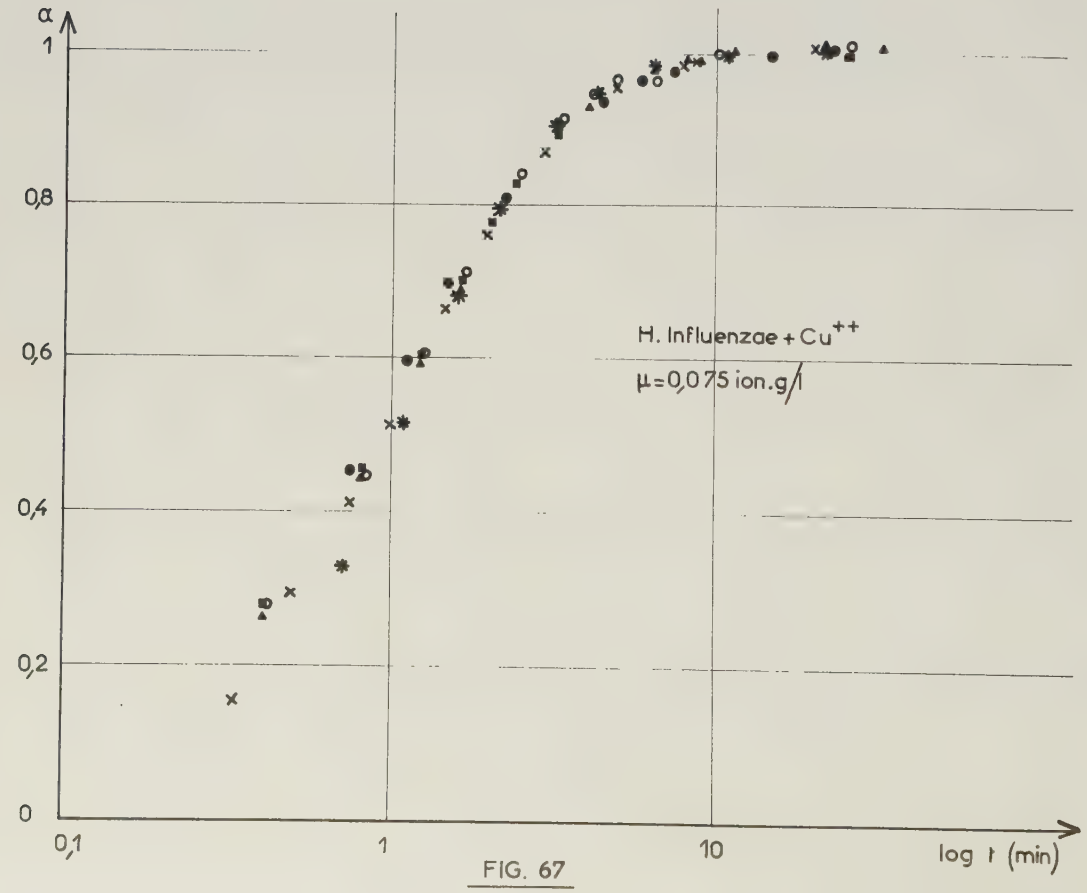

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
H. Influenzae + Cu++
μ = 0,075 ion. g/l
0,1
1
10
log t (min)

FIG. 67

42) *Erreurs entraînant une modification de la vitesse de "renaturation" (solutions cuivriques)*

Le nombre de paramètres agissant sur la vitesse de "renaturation" étant grand, il est possible qu'on ne puisse pas les fixer de façon rigoureusement reproductible.

Il s'ensuit alors une irreproductibilité non pas de forme de courbe, mais de vitesse de "renaturation". La fig 66 représente six "renaturations" effectuées exactement dans les mêmes conditions :

DNA de H. Influenzae - Solution non centrifugée.
a = 2,5
T_1 = 55° C
T_2 = 25° C
μ = 0,075 ion-g/l
Manipulations sur le Cary 16.

Ces courbes $\alpha = \varphi$ (log t) ont la même forme comme on peut le voir sur la fig 67, tout au moins à la précision avec laquelle on sait déterminer α.

Les 6 courbes se déduisant les unes des autres par translation parallèle à l'axe des abscisses représentent des "renaturations" de vitesses différentes. L'écart maximum entre elles est tel que

$\frac{k_\mu}{(k_\mu)_o} \sim 1,8\text{-}2$, la courbe la plus lente étant choisie pour courbe d'origine.

Le paramètre μ, force ionique de "renaturation" semble difficile à fixer de manière reproductible. La description du mode opératoire (Ch II - 541) indique en effet que l'erreur sur μ est sensiblement la même que l'erreur sur la détermination du volume V de DNA à "renaturer", soit environ 1 %. D'après la fig 50, représentant Log $k_\mu = f(\sqrt{\mu})$, une telle erreur décalerait les courbes en donnant $k \sim 2$.

L'écart entre les courbes de la fig 66, apparaissant comme une irreproductibilité des mesures est donc attribuable à l'erreur sur le paramètre μ.

	Cary 14	Cary 16
Mesure de la D.O. initiale - Cellule Hellma	1 %	0,5 %
Nombre de cm^3 chauffés n	10 cm^3	2,5 cm^3 (extraits de la cellule ayant servi à mesurer la D.O. initiale)
Mesure de d_1 avant "renaturation" Cellule Hellma	1 %	0,5 %
Erreur sur l'effet hyperchromique h	2 %	1 %
Mesure de d_2 en fin de "renaturation"	Cellule de thermostatation 2 %	Cellule Hellma 0,5 %
Calcul de d_1 initiale	4 %	1,5 %
Cinétique enregistrée	Au début du mélange DNA + $Na_2 SO_4$ erreur sur t et α pour les premiers points 8 %	10 s après le mélange absence du début de la cinétique
Analyse → $\alpha = \frac{d_1 - d}{d_1 - d_2} = \varphi(\log t)$ Inconvénient : utilise deux fois d_1, grandeur déterminée par le calcul avec une mauvaise précision.	Les erreurs portées sur les courbes "uniques" ont été déterminées empiriquement : elles sont le résultat d'un grand nombre d'expériences.	4 %
Analyse $(1 - \alpha) = \frac{d - d_2}{d_1 - d_2}$		
$\frac{\Delta(d - d_2)}{d_1 - d_2}$	3 % minimum ($d - d_2$ grand)	0,7 % minimum
	50 % maximum($d - d_2$ petit)	50 % maximum

- TABLEAU IV -

43) *Erreurs sur les courbes de "renaturation" des solutions zinciques*

Ce que nous venons de dire au sujet des "renaturations" des solutions cuivriques de DNA est transposable à celles des solutions zinciques. Seul le paramètre μ n'intervient pas puisque la "renaturation" est alors déclenchée par simple refroidissement. Le système que nous avons mis au point (Ch. II-551, 552) permet d'effectuer un traitement thermique de chauffage et trempe reproductible.

Si l'on souhaite comparer les courbes "uniques" relatives aux différents systèmes envisagés, il faudra tenir compte de la précision avec laquelle chacune d'entre elles a été déterminée.

44) *Précision sur la détermination du degré d'évolution α par dosage des ions Cu^{++}*

Elle dépend de l'erreur sur le potentiel de l'électrode E et de l'erreur sur la détermination des limites E_1 et E_2.

Au cours de la transformation le potentiel E serait connu à chaque instant t à 1 % près par rapport à la différence $(E_1 - E_2)$ s'il n'y avait pas de dérive.[+] Nous avons montré (Ch. II-57) que cette dérive, attribuable à l'électrode de référence est systématique : on peut donc l'évaluer et, par conséquent en tenir compte. Ainsi, la limite E_2 atteinte par le potentiel en fin de transformation peut aussi être lue à 1 % près par rapport à la différence $(E_1 - E_2)$.
Ceci suppose, naturellement, qu'on choisisse une cinétique d'évolution assez rapide pour qu'une évaluation inéluctablement imparfaite de la dérive ne soit pas amplifiée par un temps d'observation trop long (de l'ordre de quelques heures par exemple).

La détermination de E_1 est déduite de la mesure de E sur la solution de DNA "dénaturé" en présence d'ions Cu^{++} en force ionique 5.10^{-3} ion-g/l. Nous avons vu, en effet, (Ch. II-57) que l'augmentation de la force ionique d'une solution cuivrique sans DNA ramène à une correction de dilution près le potentiel à la va-

---

[+] L'existence de cette dérive est surprenante parce qu'elle a lieu en présence de DNA dans un milieu de force ionique relativement élevée, ce qui n'est pas le cas en l'absence de DNA en même force ionique .

leur qu'il avait initialement en faible force ionique. Ainsi, l'erreur sur E_1 est l'erreur sur la dilution consécutive à l'augmentation de la force ionique : elle ne peut pas excéder 1 % par rapport à la différence $(E_1 - E_2)$.

On peut montrer qu'alors l'erreur sur α est de l'ordre de 10 %. La Fig.(67 bis) montre que ne pas tenir compte de la dérive n'entraîne pas une erreur supérieure à 10 %. Nous nous sommes donc placés dans des conditions telles que l'évaluation du degré d'évolution α n'est pas entachée, compte tenu de la précision des mesures d'une trop grande erreur due à la mauvaise appréciation éventuelle de la dérive.

La Fig.(65 bis) représentant deux courbes d'évolution des ions Cu^{++} $\alpha = \varphi$ (log t) obtenues dans les mêmes conditions expérimentales, indique la bonne reproductibilité des mesures.

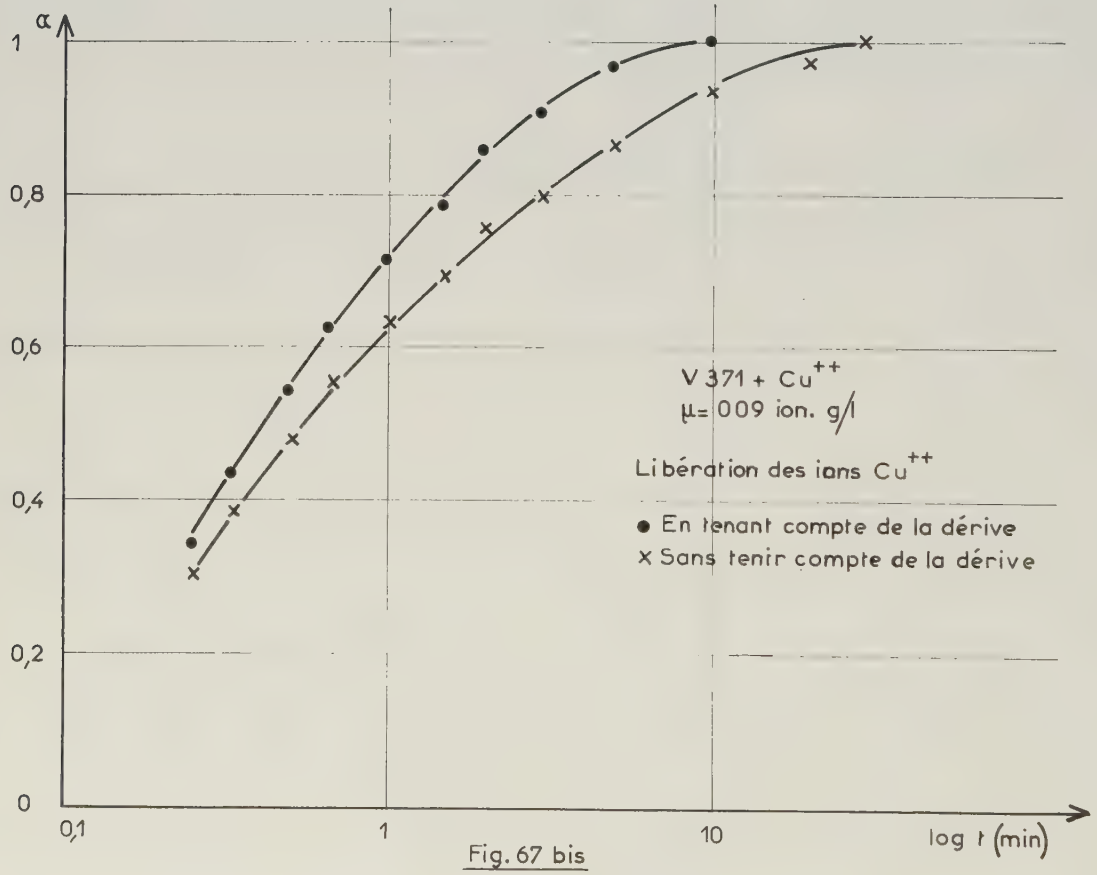


Fig. 67 bis

- Chapitre IV -

DISCUSSION DES RESULTATS ET DE LEUR ANALYSE PHENOMENOLOGIQUE

Après avoir vérifié et illustré une règle phénoménologique d'évolution des systèmes, nous nous proposons de l'utiliser afin d'essayer de comprendre le rôle et le mode d'action des ions métalliques au cours des processus de "renaturation" étudiés. Ceci nous conduit à réfléchir sur la notion de système et sur le choix d'une propriété P permettant de suivre son évolution.

L'analyse phénoménologique que nous avons faite à l'issue de l'étude expérimentale de chacun de ces systèmes nous a conduits à une courbe "unique" et à une équation caractérisant l'évolution du système considéré à condition de fixer les limites de variation des paramètres.

Si des systèmes différents conduisent à des courbes "uniques" identiques ou en d'autres termes si la courbe d'évolution $\alpha = \varphi(t)$ est la représentation commune de ces systèmes, nous dirons qu'ils sont équivalents.

La phénoménologie permet des comparaisons d'où des classements de systèmes.

1) *REFLEXIONS SUR LA NOTION DE SYSTEME*

Un système chimique S est défini par les variables P, T, n_i où P est la pression, T la température et les n_i sont les nombres de moles des constituants du système.

Dans le cas étudié la nature des constituants est :

- Les différents types de DNA (suivant la matière première à partir de laquelle ils sont préparés).
- Le sel assurant la force ionique μ' de la solution de DNA : Na_2SO_4.
- Les ions M^{++} ajoutés : Cu^{++} ou Zn^{++}.

Les variables conditionnant l'évolution du système sont : μ, T_1, T_2, Δ, θ, a ou b, etc... (Ch. III). Il faut cependant remarquer que les paramètres qui déclenchent la "renaturation" ne sont pas les mêmes en présence d'ions Cu^{++} et Zn^{++}.

Du point de vue phénoménologique, le moyen de mettre en évidence des systèmes différents est de comparer la forme des courbes $\alpha = \varphi(t)$. Comme nous l'avons déjà fait remarquer, la comparaison des courbes $\alpha = \varphi(\log t)$ est, d'un point de vue pratique, plus commode.

2) *REFLEXIONS SUR LE CHOIX D'UNE PROPRIETE P*

Lorsqu'un système possède plusieurs constituants il est souhaitable de trouver une propriété P rendant compte de l'évolution de chacun de ces constituants. Dans le cas particulier que nous avons étudié, d'une part, le DNA passe d'un état "dénaturé" à un état "renaturé" : l'effet hypochrome qui accompagne cette transformation permet de la suivre par mesure de la densité optique au maximum d'absorption du DNA. D'autre part, la concentration en ions Cu^{++} libres augmente et on peut doser cette augmentation à l'aide d'une méthode électrochimique.

Il n'est pas techniquement simple de suivre l'évolution du DNA et celle des ions Cu^{++} simultanément. Aussi avons-nous préféré utiliser ces techniques indépendamment l'une de l'autre. Des études de reproductibilité ayant été faites dans le cas de chacune de ces deux techniques, il semble raisonnable de comparer les résultats obtenus tant du point de vue qualitatif (forme des courbes) que du point de vue quantitatif (durée de l'évolution). La Fig. (67 ter) montre que le DNA de thymus de veau V 371 et les ions Cu^{++} qui lui sont associés évoluent suivant la même loi $\alpha = \varphi(t)$ et à la même vitesse.

On est tenté de conclure que l'une et l'autre propriété rend compte de la même transformation. Mais on conçoit difficilement l'identité de la transformation structurale du DNA d'une part, et l'augmentation de la concentration en ions Cu^{++} libres, d'autre part. Le système considéré est probablement décomposable en deux sous-systèmes qui peuvent être ou ne pas être indépendants.

Si on suppose que les deux sous-systèmes sont indépendants, cela veut dire que l'agent "renaturant" provoque la transformation de chacun des sous-systèmes et que leurs transformations sont à la fois identiques et simultanées. Ceci serait le fruit du hasard et parait assez improbable.

Supposons maintenant que les deux sous-systèmes ne soient pas indépendants et que leurs transformations soient successives, celle de la cause précédant naturellement celle de l'effet. On ne peut alors comprendre que les deux propriétés rendant compte de l'évolution des deux sous-systèmes donnent à la fois la même loi et la même vitesse d'évolution que si la transformation de l'un des deux sous-systèmes est beaucoup plus lente que celle de

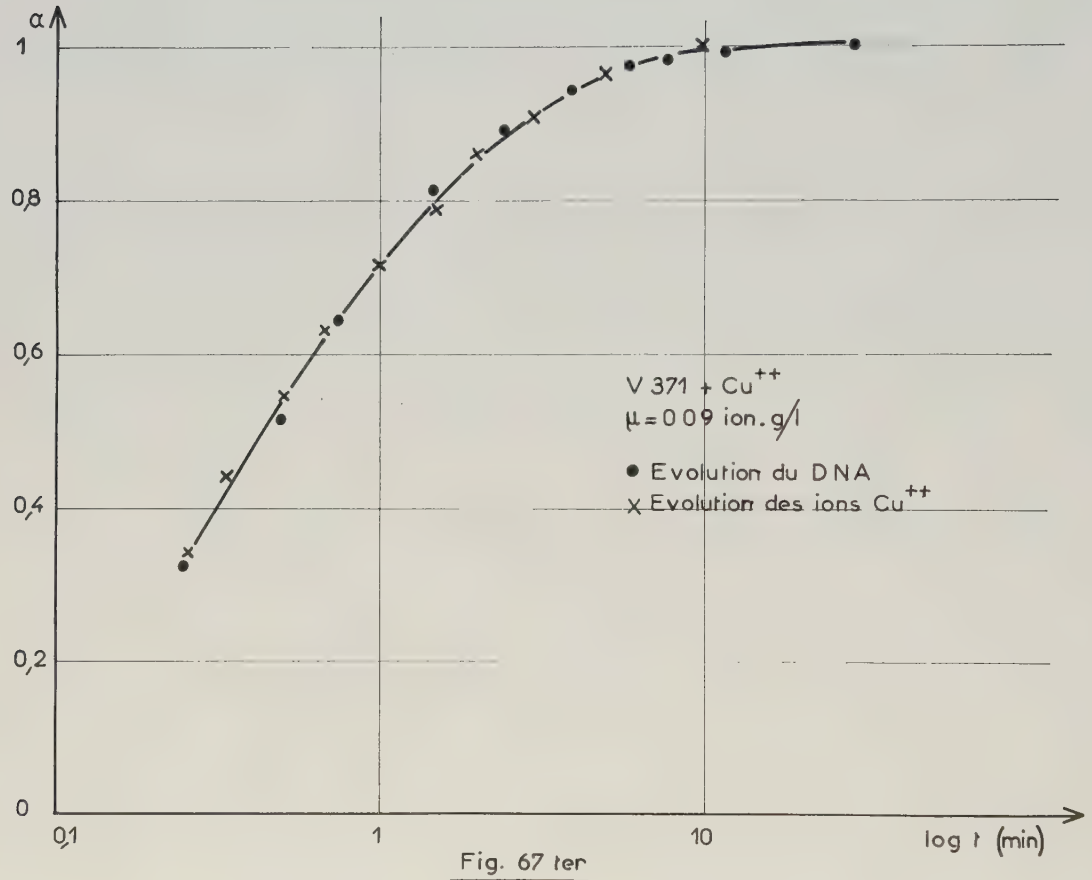

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
V 371 + Cu++
μ = 0 0 9 ion. g/l
● Evolution du DNA
x Evolution des ions Cu++

Fig. 67 ter

l'autre. Alors l'une ou l'autre propriété renseigne sur la cinétique d'évolution d'un seul des sous-systèmes, celle de l'autre étant trop rapide par rapport aux moyens d'observation que nous utilisons.

Une étude du rôle de l'agent "renaturant" et des interactions DNA-Cu^{++} donnera des renseignements complémentaires précisant quelle transformation est la cause. Si la cause est lente, il s'ensuit que l'effet est très rapide. De plus le couplage entre les deux sous-systèmes crée une pseudo-simultanéité de leurs transformations c'est-à-dire que chaque fois qu'une étape de la cause est réalisée il s'ensuit immédiatement une étape de l'effet. Si on admet comme nous le verrons lors de l'étude du mécanisme que la libération des ions Cu^{++} est la cause de la "renaturation", c'est donc en définitive cette transformation que met en évidence aussi bien le dosage électrochimique que la mesure de l'hypochromicité.

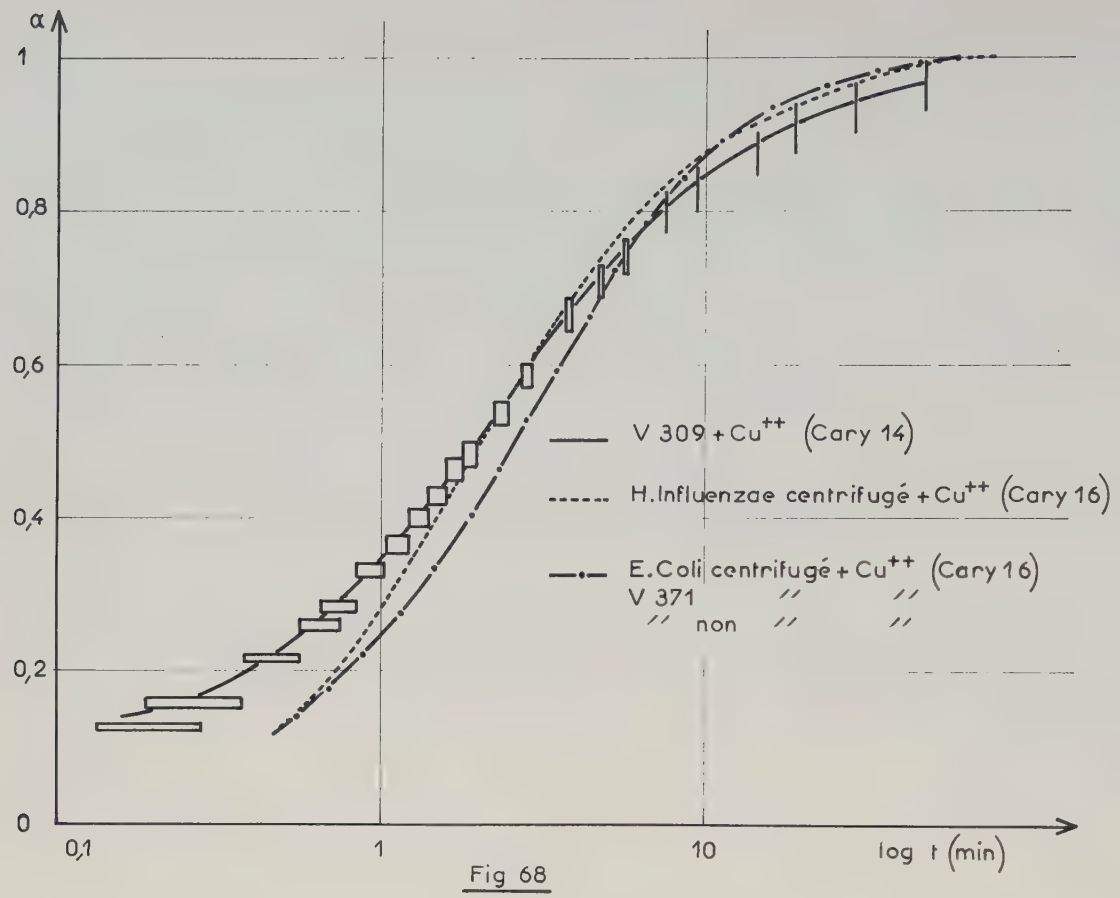

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
V 309 + Cu++ (Cary 14)
H. Influenzae centrifugé + Cu++ (Cary 16)
E. Coli centrifugé + Cu++ (Cary 16)
V 371 // // //
// non // //

Fig 68

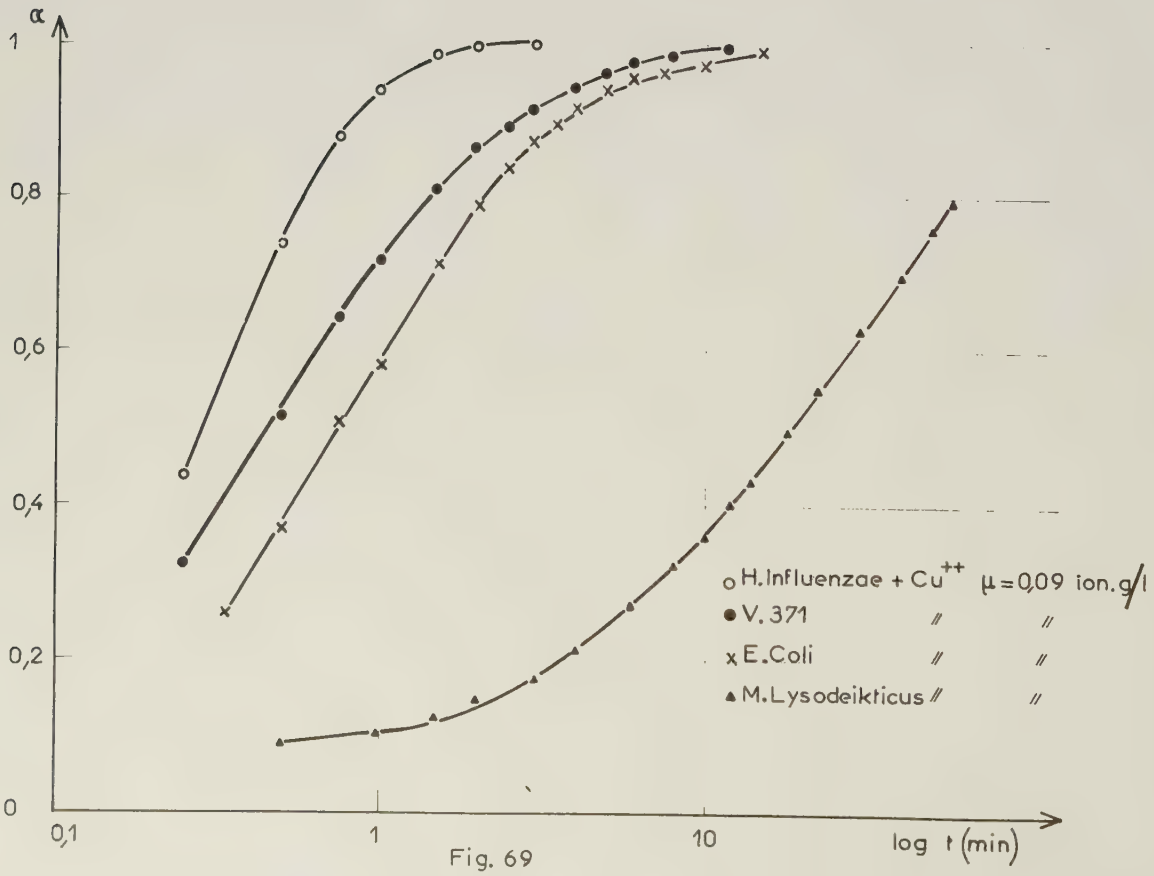

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
o H. Influenzae + Cu++ μ = 0,09 ion. g/l
● V. 371 // //
x E. Coli // //
▲ M. Lysodeikticus // //

Fig. 69

3) *SYSTEMES EQUIVALENTS*

Nous avons, à l'aide de la règle phénoménologique, montré que les systèmes :

- DNA de thymus de veau
- DNA de E. Coli centrifugé[+]
- DNA de H. Influenzae centrifugé (fig. 68)

sont des systèmes équivalents en présence d'ions Cu^{++} dans un milieu de même force ionique. Les différents paramètres dénombrés et étudiés modifient, si on les fait varier, la vitesse d'évolution du système que nous avons défini, mais ne modifient pas sa nature puisque le loi générale d'évolution est inchangée. Leurs évolutions ont lieu à des vitesses légèrement différentes, mais cependant du même ordre de grandeur : on peut, dans tous les cas choisir la minute comme unité de temps, car la vitesse de "renaturation" est rarement assez grande pour que l'achèvement de la transformation ait lieu en moins d'une minute. La fig. (69) montre que tous les paramètres étant maintenus à la même valeur, les DNA de thymus de veau et de E. Coli sont "renaturés" pratiquement à la même vitesse alors que le DNA de H. Influenzae est "renaturé" plus vite et celui de M. Lysodeikticus plus lentement.

Cette affirmation peut paraître surprenante si on la compare aux conclusions que nous avions précédemment tirées (30 - 31). Il n'y a pas, en fait, de contradiction, car nous avons dans un premier stade étudié des solutions non centrifugées, cas où les systèmes DNA de thymus de veau et DNA de E. Coli sont différents (paragraphe suivant 2)).

Les ions Cu^{++} ou Zn^{++} sont nécessaires pour "renaturer" certains DNA tels que le DNA de thymus de veau. Ceci suggère que ces ions jouent un rôle important. Une façon de l'évaluer est de comparer ces résultats à ceux de BRITTEN et KOHNE (32) concernant la "renaturation" des mêmes DNA en l'absence d'ions Cu^{++} : les vitesses de "renaturation" sont très différentes suivant la source du DNA (le DNA

[+] Le DNA de M. Lysodeikticus n'a pas été étudié au même titre que les autres DNA car du NaCl résiduel ($\sim 10^{-6}$ M/l) formant un complexe coloré avec les ions Cu^{++} a gêné la détermination des limites de la transformation. Ainsi la précision sur la détermination de la loi générale d'évolution n'est pas assez bonne pour qu'on puisse la comparer aux lois des autres systèmes.

de E. Coli se renature 10^3 fois plus vite que le DNA de thymus de veau).

Par conséquent, l'évolution du DNA en présence d'ions est influencée par ceux-ci. Le système DNA seul est différent des systèmes DNA - Cu^{++} ou DNA - Zn^{++}.

Deux possibilités apparaissent :

- Les ions Cu^{++} modifient l'évolution du DNA par leur présence en des sites donnés : leur intervention serait statique.
- Ou bien, leur exclusion des sites ou leur changement de sites sous l'action de l'agent "renaturant" provoque la "renaturation" : leur intervention serait dynamique.

On pourrait poser le problème en d'autres termes et se demander si l'agent "renaturant" agit sur les ions fixés sur le DNA ou sur le DNA lui-même. Il n'est d'ailleurs pas exclu que l'agent "renaturant" joue à la fois ces deux rôles.

L'étude d'un agent "renaturant" autre que $Na_2 SO_4$ sera envisagée au Ch.VI.

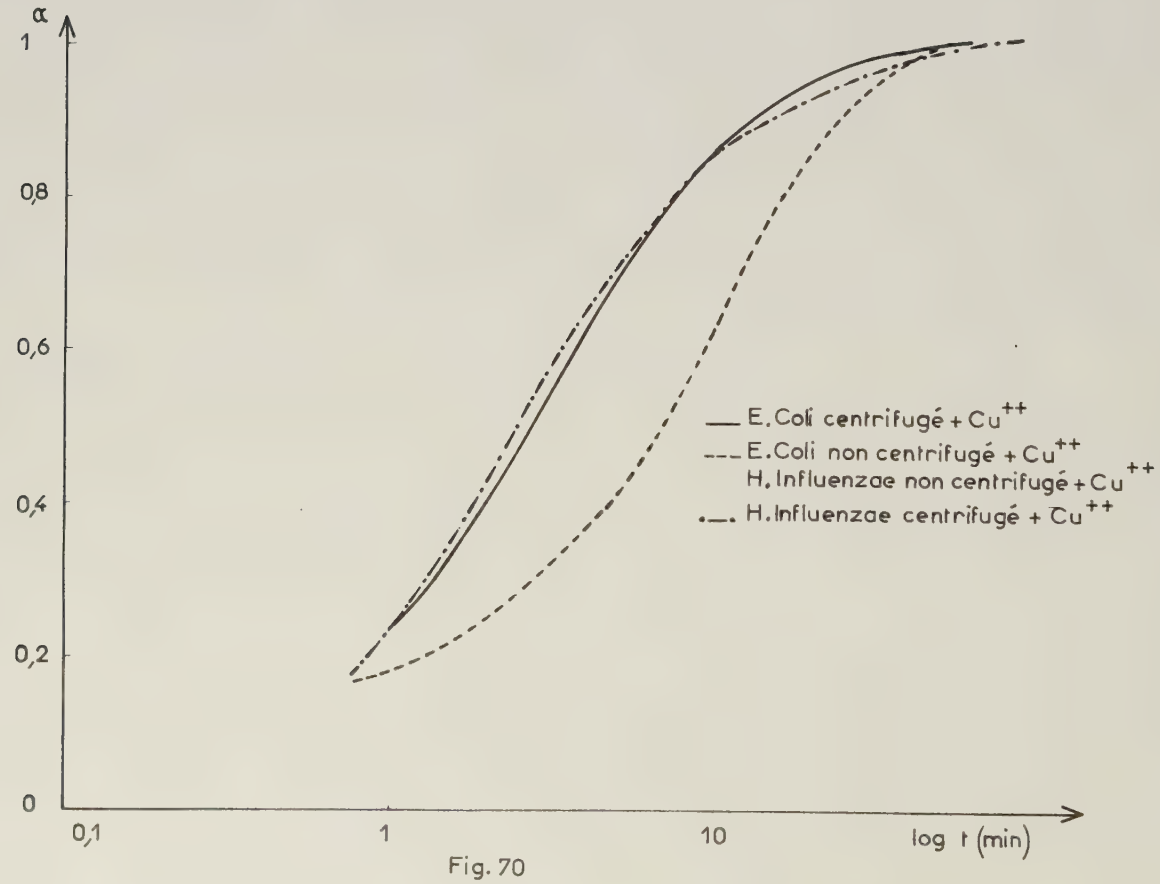


Fig. 70

4) *MISE EN EVIDENCE DE SYSTEMES DIFFERENTS*

41) *Fait expérimental*

Soient deux solutions du même échantillon de DNA de E. Coli. Elles constituent des systèmes identiques au sens où nous avons défini la notion de système : en effet, elles ne diffèrent que par le fait que l'une n'a pas été centrifugée, alors que l'autre l'a été (1 heure, 14000 t/min). Il est connu qu'un tel traitement ne fait pas précipiter le DNA.

Pourtant, si on compare les courbes "uniques" de "renaturation" de ces deux solutions, on constate que l'une constitue un système équivalent au DNA de thymus de veau, alors que l'autre donne une courbe "unique" nettement distincte (fig.70).

Par conséquent, on a par centrifugation séparé deux systèmes différents. Le DNA ne sédimentant pas dans les conditions expérimentales utilisées, il faut admettre que le système contenait une substance étrangère intervenant dans le processus de "renaturation" du DNA.

Si maintenant on fait subir le même traitement à un autre DNA bactérien : le DNA de H. Influenzae, on sépare par centrifugation deux systèmes différents entre eux, l'un étant équivalent aux systèmes DNA de thymus de veau et DNA de E. Coli centrifugé, l'autre étant équivalent au DNA de E. Coli non centrifugé.

Par contre, si on centrifuge du DNA de thymus de veau, une telle différence entre les "renaturations" de solution centrifugée et non centrifugée n'apparaît pas.

42) *Conséquences*

Nous remarquons que l'impureté est de même nature dans les deux DNA d'origine bactérienne alors qu'elle n'existe pas dans le DNA de thymus de veau.

L'application de la règle phénoménologique (Ch.I - 1) est donc intéressante si l'on veut définir la nature des systèmes. Baser nos comparaisons sur l'allure des courbes d'évolution est une méthode fondée, puisque des quantités très faibles d'impureté[+] modifient notablement le processus cinétique.

[+] Une analyse chromatographique ainsi qu'un dosage de protéines appliqués au DNA utilisé n'ont pas abouti à la mise en évidence d'une impureté. Le fait expérimental est obtenu de façon certaine mais son explication n'est pas actuellement connue.

5) LES SOLUTIONS CUIVRIQUES ET ZINCIQUES DES MEMES DNA EVOLUENT SUIVANT DES COURBES DIFFERENTES

Ceci apparait lorsqu'on compare d'une part les courbes (a) et (c) et d'autre part les courbes (b) et (d) de la fig.71 (31). Ces "renaturations" ont été effectuées sur des solutions non centrifugées.

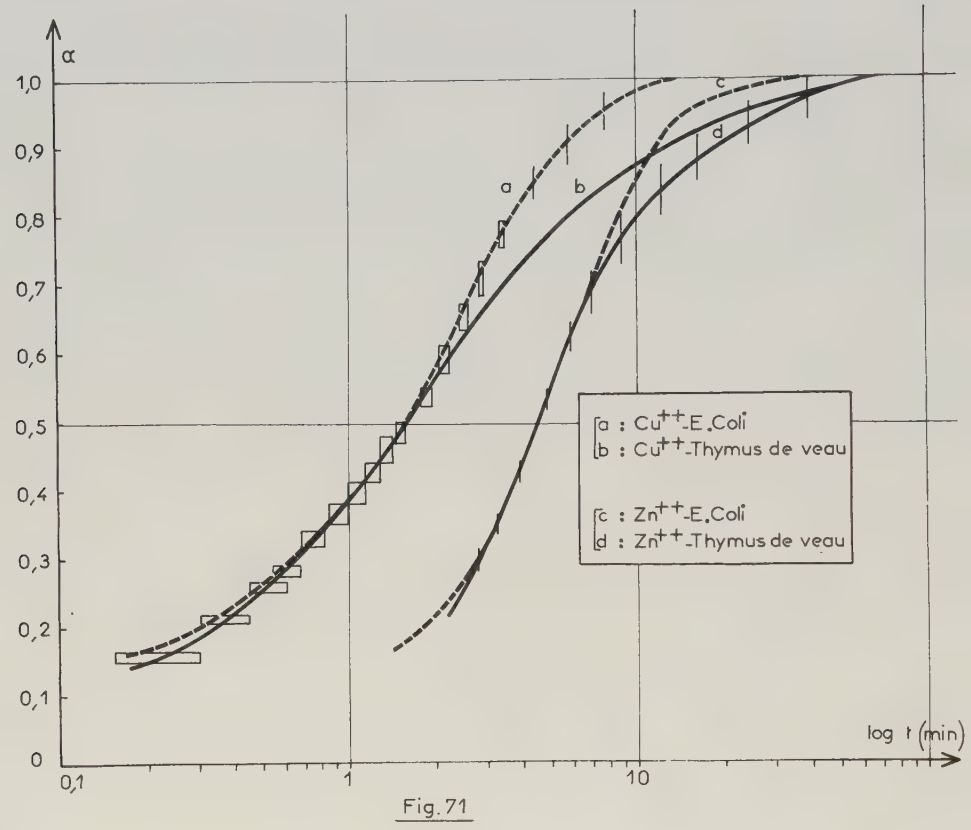


Fig.71

51) *L'initiation des "renaturations"* des solutions zinciques de DNA étant due à une variation de température de 80° C à 25° C, celle-ci n'est pas instantanée au sens où l'augmentation de la force ionique peut l'être.

D'une part, ceci peut se traduire par une indétermination sur l'origine de l'échelle des temps, ce qui entraînerait une déformation des courbes $\alpha = \varphi(\log t)$ (Ch.III - 31). Cette explication est possible mais ce n'est probablement pas la seule car changer t en $t + \Delta t$ ne suffit pas pour superposer les courbes d'évolution des solutions cuivriques et zinciques. D'autre part, lorsque la température atteint 25° C, une partie de la réaction a eu lieu de façon non isotherme et il est possible qu'une telle initiation non instantanée modifie le devenir du système en évolution.

52) *Il se peut aussi* que les sites des ions Zn^{++} soient différents de ceux des ions Cu^{++} tant à l'état initial qu'à l'état final. Le système n'évoluerait pas du même état A vers le même état B. En effet, on sait déjà que les solutions zinciques sont en évolution dans un milieu de force ionique $\mu = 5.10^{-3}$ ion-g/l alors que les solutions cuivriques dénaturées en 5.10^{-3} ion-g/l sont ensuite "renaturées" en une force ionique $\mu \sim 0,1$ ion-g/l.

Ce problème serait résolu si l'on connaissait des méthodes capables de discerner sur le DNA des sites différents de fixation d'ions. Nous verrons (Ch.V) que ce n'est actuellement pas le cas.

53) *Conséquences*

Les conditions expérimentales de "renaturation" des solutions zinciques de DNA sont telles qu'on ne peut pas, en comparant leurs courbes d'évolution à celles des solutions cuivriques, conclure sans ambiguïté que les systèmes considérés sont différents.

6) *PERSPECTIVES*

Cette approche phénoménologique étant faite, une étude complémentaire du mécanisme peut être entreprise car le problème à résoudre est posé de la façon qui suit :

- Etudier la nature des interactions entre les ions Cu^{++} ou Zn^{++} et le DNA à l'état statique dans différentes conditions de force ionique avant et après traitement dénaturant.
- Préciser le rôle de l'agent "renaturant" dans la phase d'initiation.
- Evaluer la quantité d'ions Cu^{++} mise en jeu au cours de la "renaturation" du DNA.

- Chapitre V -

ETUDE DE SOLUTIONS CUIVRIQUES ET ZINCIQUES DE DNA A L'ETAT STATIQUE

1) *INTRODUCTION*

Nous venons de voir que les propriétés du DNA sont très sensibles aux quantités d'ions cuivriques ou zinciques mis en solution. Les rapports

$\frac{Cu^{++}}{DNA - P} \sim 2$ et $\frac{Zn^{++}}{DNA - P} \sim 10$ semblent, en particulier, constituer un seuil important.

La vitesse de "renaturation" étant une fonction décroissante de la concentration en ions cuivriques, on peut penser que l'apport de ces ions contribue à la stabilisation de l'état de désordre. Pourtant, une quantité minimale de Cu^{++} est nécessaire pour que la "renaturation" totale soit possible.

Ces deux constatations mettent en évidence une contradiction apparente. On ne peut rendre ces résultats cohérents qu'en admettant qu'il existe au moins deux types de sites différents pour les ions Cu^{++} ou Zn^{++} fixés sur le DNA. Certains permettraient aux brins complémentaires de reformer, sans erreur, la double hélice initiale. D'autres, au contraire, donneraient une certaine rigidité à la structure en désordre, en maintenant l'effet hyperchromique après refroidissement et retardant plus ou moins la "renaturation".

Nous ferons, tout d'abord, une mise au point bibliographique rendant compte des résultats acquis à ce sujet. Puis, nous présenterons des expériences complémentaires que nous avons faites afin d'élucider le rôle des ions Cu^{++} ou Zn^{++} dans le cas particulier des cinétiques de "renaturation".

2) *MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE*

21) *Fixation de l'ion cuivrique sur les nucléosides et nucléotides*

De nombreux auteurs ont prouvé que l'ion cuivrique se fixe sur les nucléosides et nucléotides (18, 33, 34, 35, 36, 37).

Les sites mis en évidence sont l'azote N_7 de l'adénine et de la guanine ainsi que l'azote N_1 de la cytosine. Les nucléotides ont une action complexante plus forte que les bases et les nucléosides. ROPARS et VIOVY (1965) (37) l'expliquent par l'existence d'un groupement phosphate pouvant complexer une partie du cuivre et peut-être aussi par une augmentation du caractère basique des bases.

L'ensemble des résultats obtenus à ce sujet conduit à admettre que la guanine constitue le site "interne" actif préférentiel vis-à-vis du cuivre, le site "externe" étant le groupement phosphate.

Certains auteurs (36, 38, 39) ont mis en évidence dans le cas de nucléosides mono ou triphosphates une liaison entre $PO^{=}$ et l'N_7 des purines.

22) *Fixation de l'ion cuivrique sur le DNA natif*

PING-YAO CHENG (40) déduit des mesures de dispersion rotatoire en U.V. que la liaison du DNA avec les ions Cu^{++} ou Zn^{++} produit des changements de conformation subtils, mais il ne fait pas d'hypothèses au sujet des sites de fixation.

G.L. EICHHORN et P. CLARK (17) pensent que l'ion cuivrique ne se fixe pas sur les bases du DNA à température ordinaire, mais ils ne présentent pas d'appui expérimental à ce sujet.

Par contre, J.H. COATES, D.O. JORDAN et V.K. SRIVASTAVA (45) déduisent du spectre de l'ion $Cu(H_2O)_6^{++}$, dans le visible, que l'ion Cu^{++} n'est lié aux bases qu'à température élevée.

Plus nombreux sont les auteurs (16, 37, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50) qui affirment que l'ion cuivrique peut être fixé sur les bases du DNA natif.

S. HIAI (16), d'une part, H. VENNER et CH. ZIMMER (42) d'autre part, n'ayant pas de preuve expérimentale, n'ont fait que suggérer cette idée.

D. BACH et I.R. MILLER (43) ont mis en évidence, par polarographie, plusieurs types de sites, mais il n'ont pas su en préciser la nature.

I.E. MINCHENKOVA et V.I. IVANOV (44) ont pu montrer, par une méthode indirecte, que les ions Cu^{++} se fixent sur les bases du DNA natif. Ils ont, en effet, réduit sélectivement le Cu^{++} fixé sur le DNA en Cu^{+}, puis ils ont dosé

spectrophotométriquement le complexe DNA-base-Cu^{+} : il apparaît une nouvelle bande d'absorption dont le maximum est à 280 nm ; elle est attribuée au complexe DNA-base-Cu^{+}.

C. ROPARS et R. VIOVY (37, 45, 46) ont pu distinguer, à l'aide de la R.P.E. (Résonance Paramagnétique Electronique), trois sortes de sites :

- les sites externes où les ions Cu^{++} sont en interaction électrostatique avec les groupements phosphates
- les sites externes dans lesquels les ions Cu^{++} forment des liaisons covalentes avec les phosphates
- les sites internes constitués par les bases

J.P. SCHREIBER et M. DAUNE (47), après avoir dosé, par polarographie, le Cu^{++} fixé et, sachant que le Mn^{++} ne se lie qu'aux phosphates dans les conditions de force ionique considérées, ont conclu que le Cu^{++} ne pouvait être fixé que sur les bases. Ils ont, d'autre part, montré que le nombre de sites occupés par les ions Cu^{++} est égal au nombre de paires de bases adjacentes formées uniquement de guanine et de cytosine.

M. DAUNE et J. CHAMBRON (49) ont utilisé la technique de spectrophotométrie différentielle et l'analyse des courbes de fusion par la méthode de FELSENFELD permettant de distinguer la fusion des paires de base A-T de celle des paires de base G-C. Cette technique indique que les paires de base G-C sont stabilisées de façon préférentielle, en présence de Cu^{++}. Mais un excès de Cu^{++} provoque une diminution non spécifique de la température de transition. La conclusion des auteurs est qu'il existe deux types différents de sites. Un petit nombre serait accessible à l'ion Cu^{++}, à 20° C, et leur saturation s'accompagnerait de l'augmentation de la température de transition. Un nombre plus important ne serait accessible qu'à partir d'une certaine température. La fixation du Cu^{++} dans ces derniers sites provoquerait une distorsion locale de la double hélice, en diminuant sa stabilité (EICHHORN et CLARK - 1965) (33).

La même technique peut être utilisée, à température ordinaire, pour des mesures en fonction de la concentration en Cu^{++} (S.E. BRYAN et E. FRIEDEN) (53). Elle rend compte de la perturbation des bases, sans toutefois distinguer, comme précédemment, les plateaux G-C des plateaux A-T.

Lorsque $10 < \frac{Cu^{++}}{DNA - P} < 100$, l'effet du Cu^{++} sur les bases est très sensible. Mais lorsque $1 < \frac{Cu^{++}}{DNA - P} < 10$, le spectre des bases n'est que légèrement perturbé.

Récemment, J.P. SCHREIBER et M. DAUNE (48) ont effectué une étude systématique de la fixation de l'ion cuivrique sur le DNA en utilisant différentes techniques telles que spectrophotométrie, diffusion de la lumière, analyse des courbes de fusion, mesures hydrodynamiques (sédimentation et viscosité). Ils se sont plus particulièrement intéressés aux solutions de force ionique de 5.10^{-3} M $NaClO_4$ et 0,1 M $NaClO_4$ et ont caractérisé les complexes à la fois du point de vue stoechiométrie, sites de fixation et modifications de la configuration du DNA.

1) Leurs résultats concernant les mesures de spectrophotométrie différentielle sont donnés au Ch.V - II.

2) L'utilisation du diagramme de Scatchard afin de déterminer le nombre de sites et la constante d'association montre :

- qu'en 0,1 M

si A_o : concentration de M^{++} libre en équilibre avec le complexe

r : nombre de moles M^{++} liées par mole de DNA - P

n : nombre de sites identiques par mole de P

k : constante d'association intrinsèque commune à tous les sites

les isothermes $\frac{r}{A_o} = f(r)$ sont des droites dont la pente k est la même pour différents DNA en solution dans des solvants de différentes forces ioniques mais que par contre, le nombre de sites varie en fonction de ces deux types de paramètres (51). La technique utilisée pour doser les ions libres est la polarographie.

Le même traitement appliqué aux solutions de force ionique 5.10^{-3} M $NaClO_4$ conduit à la mise en évidence d'un nombre plus grand d'ions fixés mais à une constante d'association plus faible.

Des résultats très récents (non publiés) ont montré que, dans ces conditions de force ionique, le nombre de sites est n = 0,5 quelle que soit la nature du DNA.

3) L'analyse des courbes de fusion par la méthode de FELSENFELD indique qu'en 0,1M :

- il y a stabilisation des paires G-C sans modification des paires A-T si la quantité de Cu^{++} total est faible (3 %).

- il y a déstabilisation simultanée des paires A-T et G-C si on augmente la quantité de Cu^{++} total (30 %).

Conclusion :

La fixation des ions cuivriques sur les bases du DNA, à température ordinaire, semble donc être un fait expérimental bien acquis.

23) Fixation de l'ion cuivrique sur le DNA dénaturé

Les ions cuivriques se fixent plus facilement sur le DNA dénaturé que sur le DNA natif (37). D'une part, les bases sont alors plus accessibles, d'autre part, des liens covalents du type (P - O - Cu - O - P) peuvent se produire, soit entre phosphates d'une même chaîne, soit peut-être entre phosphates de deux chaînes voisines. Beaucoup de résultats rendant compte de la formation d'agrégats à l'état dénaturé sont en faveur de cette dernière hypothèse.

Dans le cas particulier des études de "renaturation", la connaissance de la quantité d'ions Cu^{++} fixés et de leur mode de fixation serait très intéressante : cela conditionne, en effet, la conformation du DNA.

24) Conséquences

L'analyse des travaux antérieurs[+] ayant mis en évidence la fixation des ions sur le DNA tant à l'état natif qu'à l'état dénaturé, nous avons choisi des techniques sensibles à cette fixation (spectrophotométrie différentielle S.D. (Ch.II - 412), dispersion optique rotatoire D.O.R. et dichroïsme circulaire D.C. (CH.II - 42) afin de comparer les états natifs,"dénaturés" puis "renaturés".

[+] A la date à laquelle cette analyse bibliographique a été faite, le travail de Ch. ZIMMER et H. VENNER (54) n'était pas encore paru : ils ont en particulier bien mis en évidence la fixation des ions Cu^{++} sur les bases G-C mais ils n'ont pas exclu totalement la possibilité de fixation sur les bases A-T.

3) *RESULTATS EXPERIMENTAUX*

31) *Spectrophotométrie différentielle*

311) Fixation des ions sur le DNA natif.

Une étude de la fixation des ions Cu^{++} sur le DNA a été effectuée de façon complète par J.P. SCHREIBER et M. DAUNE (48).

Ils ont utilisé des solutions de DNA à la concentration de 3.10^{-4} DNA - P/l, les solvants étant des solutions de $NaClO_4$ de forces ioniques 1 M ; 0,1 M; 5.10^{-3} M et les quantités d'ions cuivriques ajoutées variant de 1.10^{-6} M à 8.10^{-4} M.

Les spectres différentiels observés présentent :

- un maximum mal défini entre 290 et 280 nm
- un maximum bien défini vers 211 nm
- un minimum à 245 nm
- 2 points isobestiques : l'un à 261,5 nm et l'autre à 235 nm

Nous avons étudié de la même manière la fixation des ions Zn^{++} ($b = \frac{Zn^{++}}{DNA - P}$) sur le DNA de thymus de veau V 309 dissous dans $Na_2 SO_4$ 5.10^{-3} ion-g/l (fig.72), puis 0,1 ion-g/l (fig.73).

Comme dans le cas des ions Cu^{++}, on observe :

- un maximum mal défini entre 290 et 280 nm
- un minimum vers 245 nm
- 2 points isobestiques : l'un vers 267 et l'autre vers 230 nm

Nous n'avons pas explicitement confirmé le maximum vers 211 nm, mais à 220 nm, longueur d'onde à laquelle nous avons limité nos mesures, on distingue nettement l'amorce d'un maximum de $\Delta (D.O.)$.

Les écarts à la densité optique initiale $\Delta (D.O.)$ augmentent au fur et à mesure que la quantité d'ions Zn^{++} ajoutée augmente. Ils atteignent une valeur maximale lorsque le rapport $b = \frac{Zn^{++}}{DNA - P}$ est de l'ordre de 4.

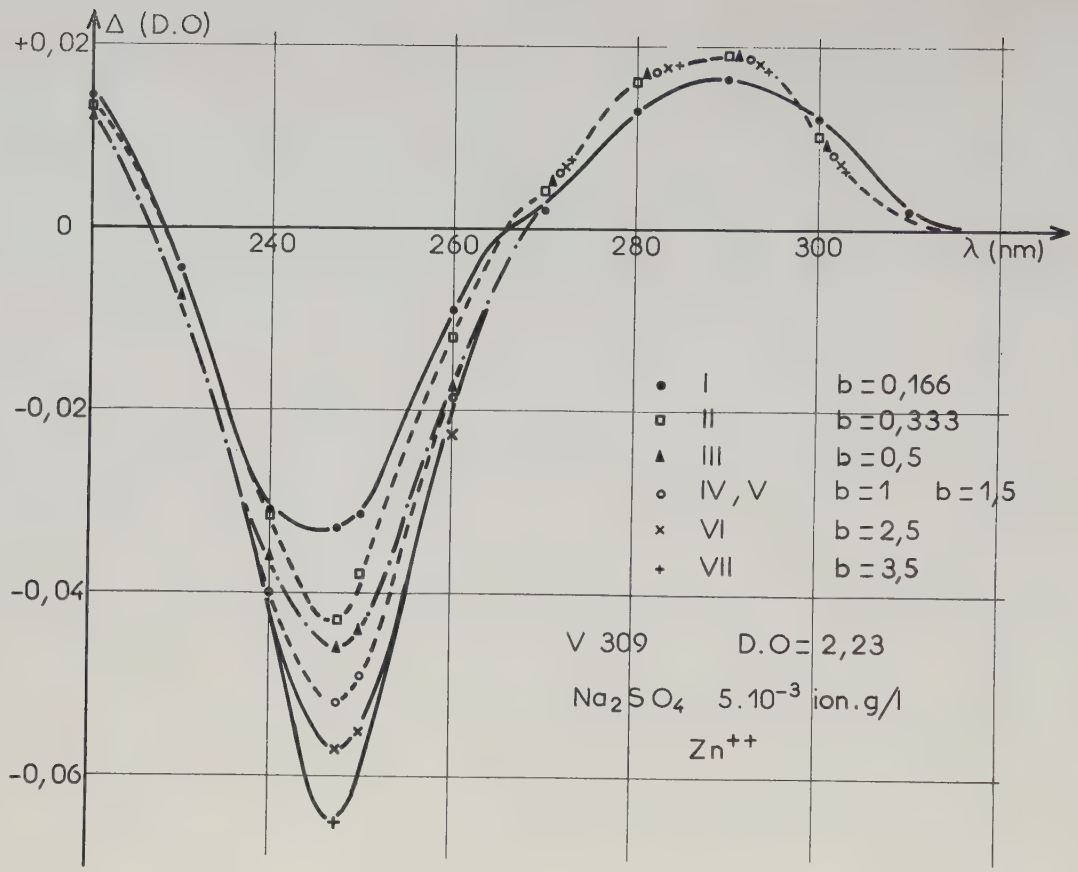

Δ (D.O)
+0,02
0
-0,02
-0,04
-0,06
240
260
280
300
λ (nm)
I b = 0,166
II b = 0,333
III b = 0,5
IV, V b = 1 b = 1,5
VI b = 2,5
VII b = 3,5
V 309 D.O = 2,23
Na2SO4 5.10-3 ion.g/l
Zn++

Fig. 72

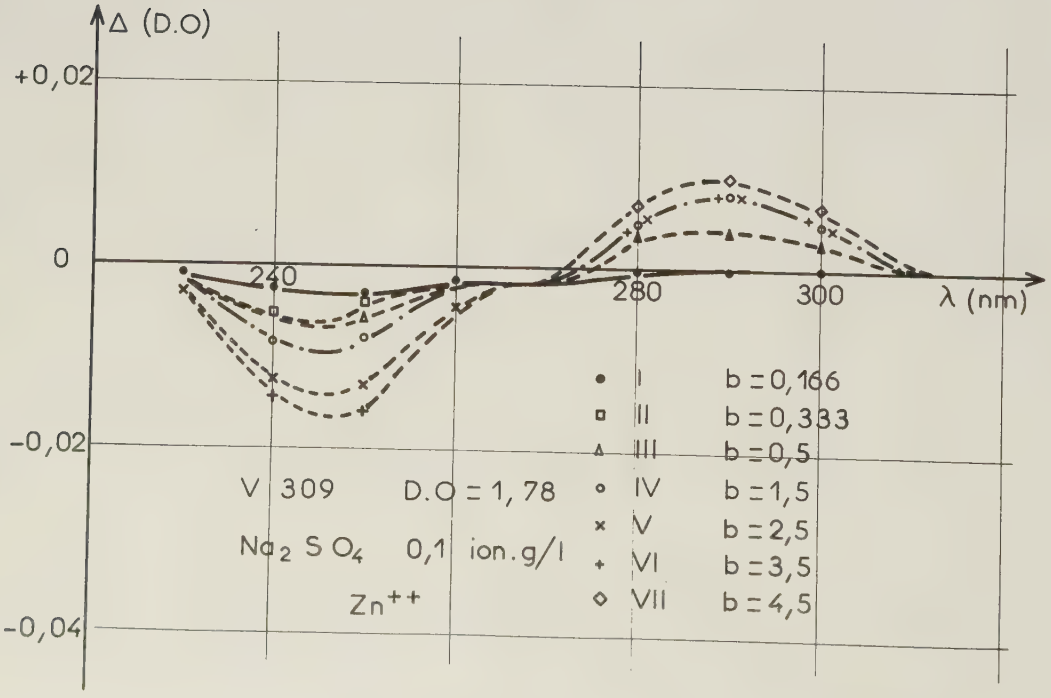

Δ (D.O)
+0,02
0
-0,02
-0,04
240
280
300
λ (nm)
I b = 0,166
II b = 0,333
III b = 0,5
IV b = 1,5
V b = 2,5
VI b = 3,5
VII b = 4,5
V 309 D.O = 1,78
Na2SO4 0,1 ion.g/l
Zn++

Fig. 73

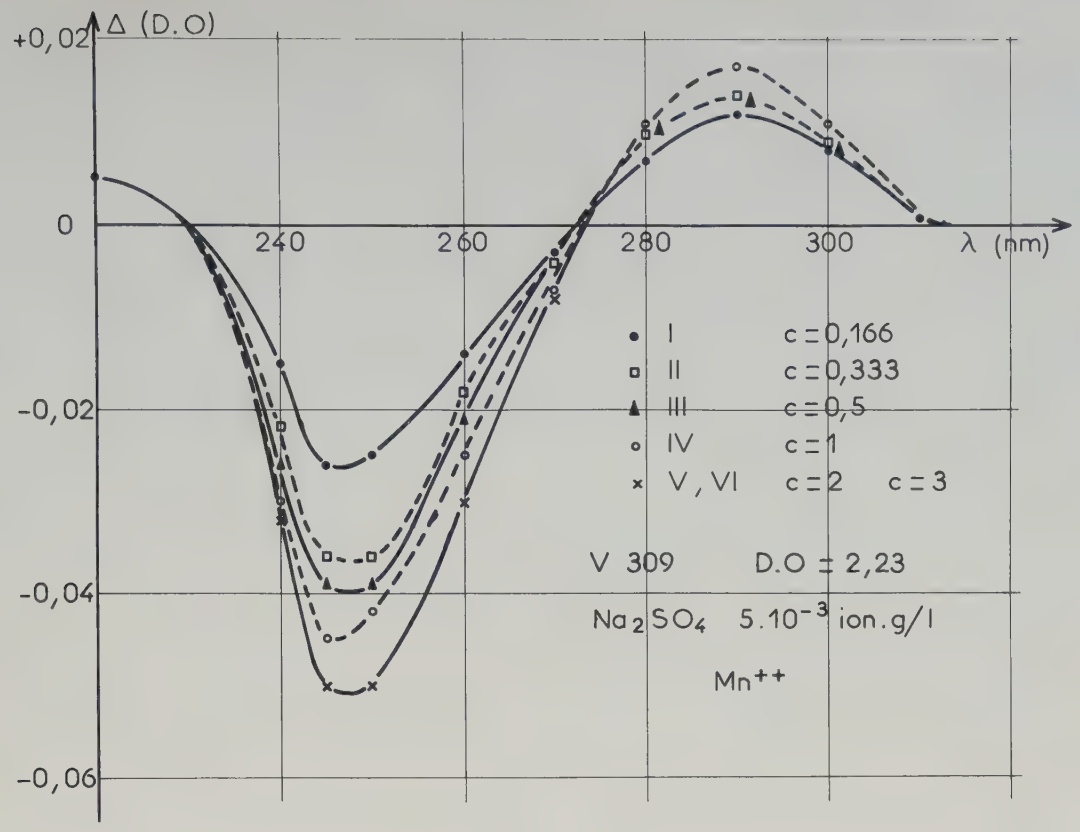

Δ (D.O)
+0,02
0
-0,02
-0,04
-0,06
240
260
280
300
λ (nm)
I c = 0,166
II c = 0,333
III c = 0,5
IV c = 1
V, VI c = 2 c = 3
V 309 D.O = 2,23
Na2SO4 5.10-3 ion.g/l
Mn++

Fig. 74

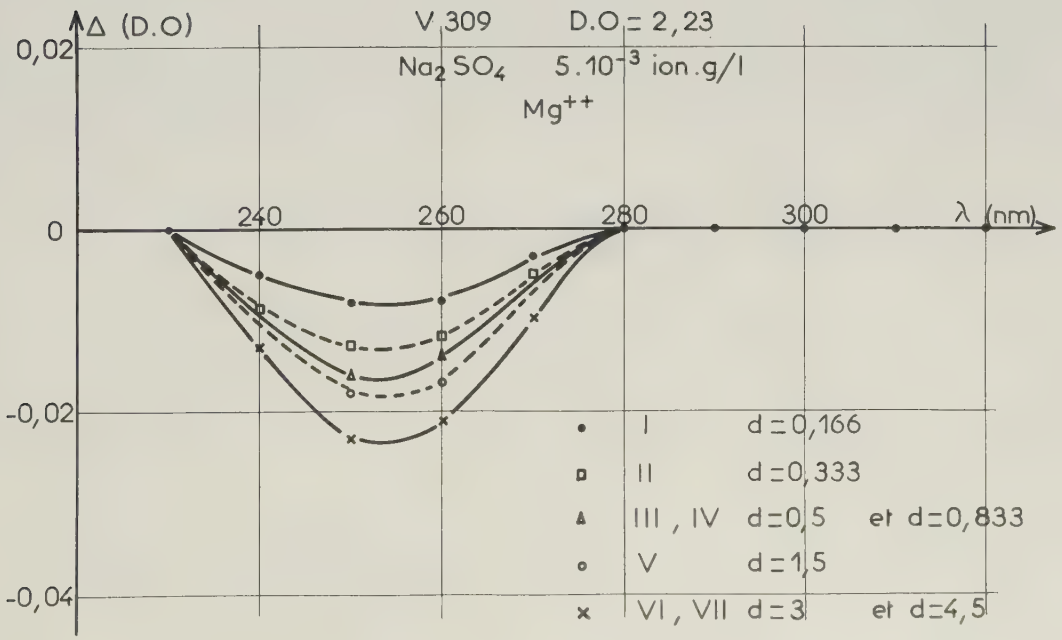

Δ (D.O)
V 309 D.O = 2,23
Na2SO4 5.10-3 ion.g/l
Mg++
0,02
0
-0,02
-0,04
240
260
280
300
λ (nm)
I d = 0,166
II d = 0,333
III, IV d = 0,5 et d = 0,833
V d = 1,5
VI, VII d = 3 et d = 4,5

Fig. 75

En utilisant des solutions de DNA de densité optique D.O. = 2, on détecte des $\Delta\ (D.O.)_{max}$ (vers λ = 245 nm) de 1 % si la force ionique est 0,1 ion-g/l et 3 % si elle vaut 5.10^{-3} ion-g/l.

. Des résultats tout à fait similaires ont été obtenus en étudiant l'action des ions Mn^{++} sur le DNA de thymus de veau V 309 (fig.74). On appelle c le rapport Mn^{++}/DNA - P, l'amplitude maximum du spectre différentiel est atteinte pour c = 2.

. J.P. SCHREIBER et M. DAUNE ont par ailleurs montré à l'aide de la même technique qu'il en est de même pour les ions Fe^{++} et Ni^{++}.

. Par contre, les ions Mg^{++} ajoutés au DNA V 309 (fig.75) donnent un spectre différentiel du DNA présentant un seul minimum vers 255 nm. On appelle d le rapport $\frac{Mg^{++}}{DNA - P}$. L'amplitude maximum du spectre différentiel est atteinte pour d = 3.

312) Fixation des ions sur le DNA dénaturé (par chauffage à 85° C).

Il faut d'abord mettre en évidence la modification du spectre du DNA chauffé en présence d'ions Zn^{++} par rapport à celui du DNA natif contenant la même quantité d'ions Zn^{++} : soit le spectre différentiel (I).

Il faut ensuite tenir compte du spectre du DNA dénaturé par rapport à celui du DNA natif en l'absence d'ions Zn^{++} : soit le spectre différentiel (II) (fig.76).

La différence (I) - (II) représentée sur la fig.77 donne, pour deux valeurs du rapport $b = \frac{Zn^{++}}{DNA - P}$, une indication sur la fixation des ions Zn^{++} sur le DNA à 85° C. La fig.77 montre aussi que le spectre différentiel est le même si l'on ajoute les ions Zn^{++} à la solution de DNA avant chauffage (x) ou après chauffage (+).

Nous pouvons remarquer que la position des extremums et d'un des points isobestiques (vers 270 nm) sont les mêmes que lorsque l'on fixe du Zn^{++} à température ordinaire. Quant au point isobestique vers 230 nm, il est déplacé vers les grandes longueurs d'onde ; mais, étant donnée la précision des mesures, cet écart ne semble pas significatif. Il en est de même pour le maximum à 210 nm.

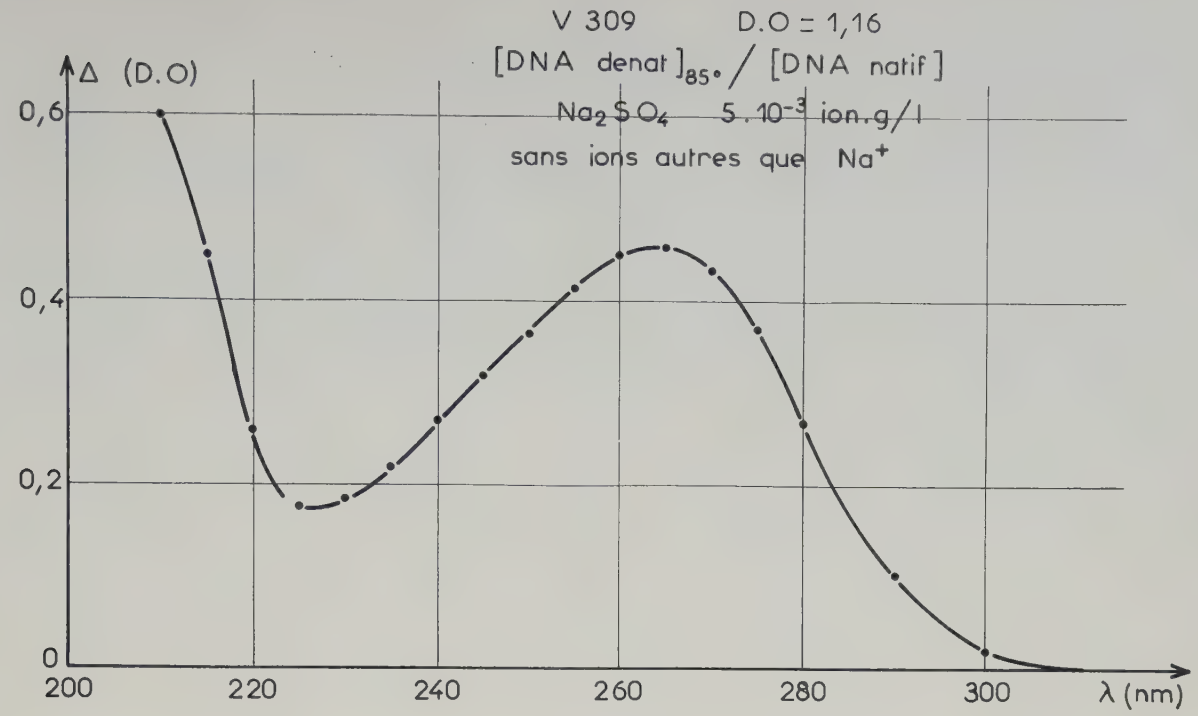

V 309 D.O = 1,16
[DNA denat]85° / [DNA natif]
Na2SO4 5.10-3 ion.g/l
sans ions autres que Na+
Δ (D.O)
0,6
0,4
0,2
0
200
220
240
260
280
300
λ (nm)

Fig. 76

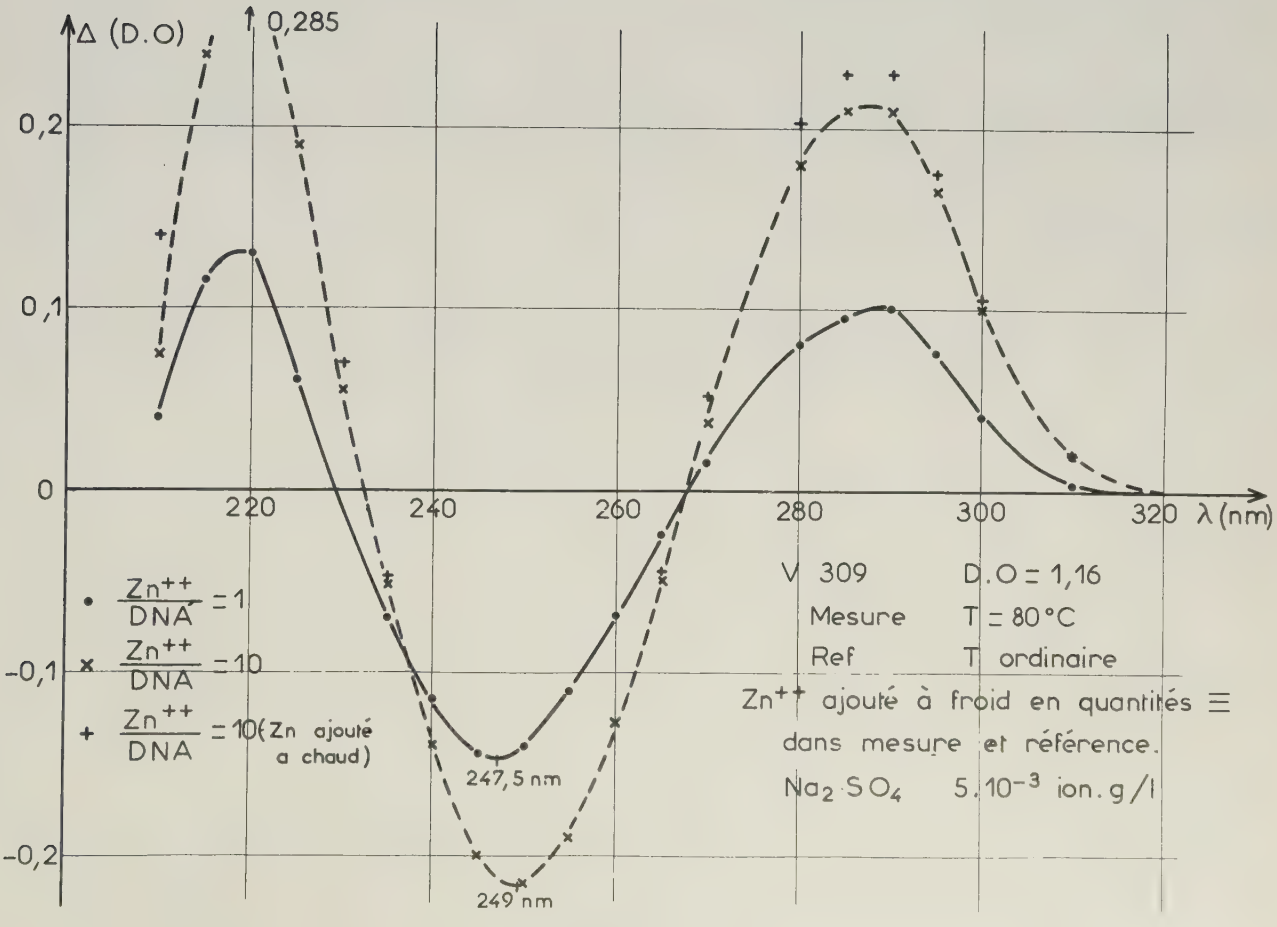

Δ (D.O)
0,285
0,2
0,1
0
-0,1
-0,2
220
240
260
280
300
320
λ (nm)
Zn++/DNA = 1
Zn++/DNA = 10
Zn++/DNA = 10 (Zn ajouté a chaud)
247,5 nm
249 nm
V 309 D.O = 1,16
Mesure T = 80°C
Ref T ordinaire
Zn++ ajouté à froid en quantités ≡ dans mesure et référence.
Na2SO4 5.10-3 ion.g/l

Fig. 77

Lorsque b = 10 l'amplitude maximum du spectre différentiel atteint 10 %.

313) Position du maximum d'absorption du DNA au cours de la "renaturation"

La déformation du spectre du DNA à l'état dénaturé en présence d'ions Cu^{++} ou Zn^{++} est assez grande pour être visible sans le recours de la spectrophotométrie différentielle : le maximum d'absorption est déplacé de 3 à 4 nm vers les grandes longueurs d'onde.

On peut donc suivre le départ des ions Cu^{++} par exemple, en pointant le maximum au cours de la "renaturation".

La fig.78 représente le degré d'évolution $\alpha = \varphi(t)$ et la position du maximum $\lambda_{max} = \varphi'(t)$ au cours de la "renaturation" d'une solution cuivrique de DNA.

Bien que le pointé du maximum ne soit pas précis (erreur de 10 % environ), on peut, par cette méthode, mettre en évidence deux points importants :

- D'une part, le départ des ions Cu^{++} des sites du DNA vers le solvant est progressif. Par conséquent, le phénomène suivi n'est pas le simple réarrangement du DNA après un départ instantané d'ions Cu^{++}, mais plutôt le réarrangement du DNA au fur et à mesure du départ progressif des ions Cu^{++}.

- D'autre part, il semble que les ions Cu^{++} responsables du déplacement du maximum aient quitté le DNA dès que le degré d'évolution α est d'environ 0,6.

314) Discussion

Précisons à l'aide du schéma suivant la disposition relative des spectres dont on fait la différence afin de comprendre la signification des spectres différentiels observés.

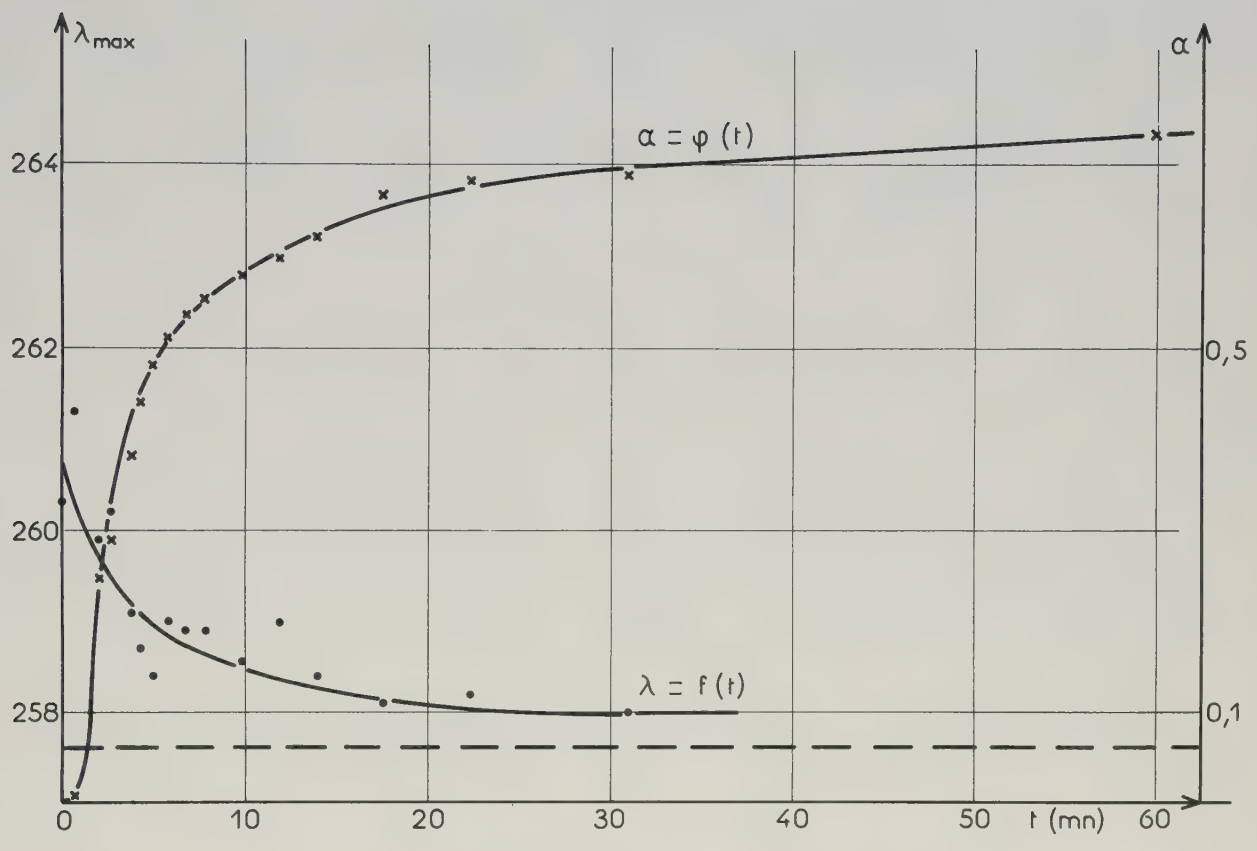
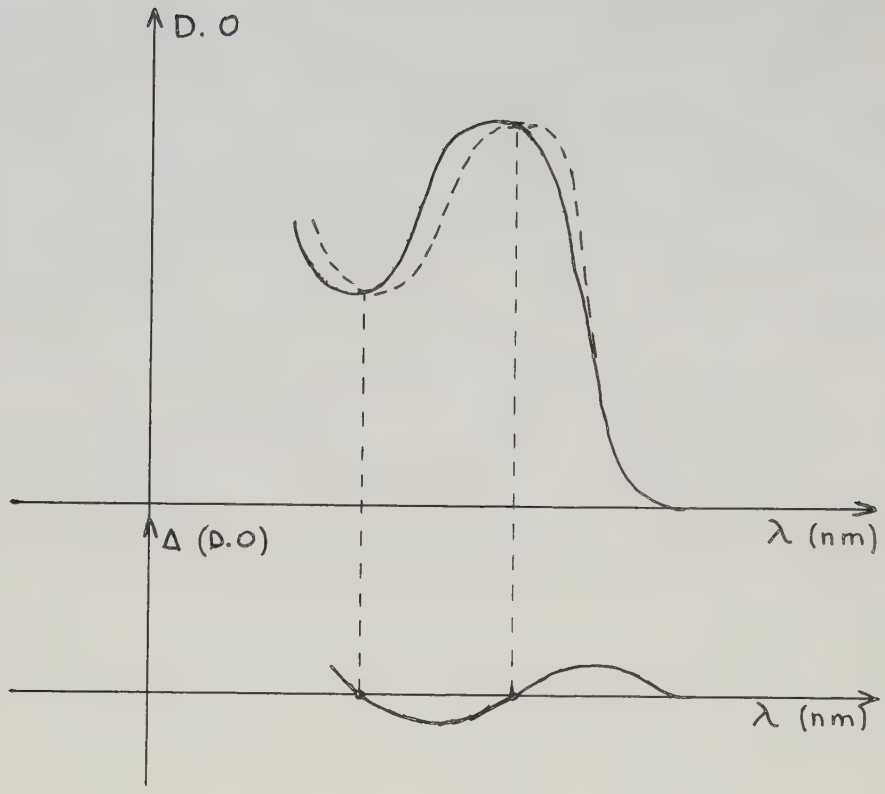


Fig. 78



Une possibilité d'explication des spectres différentiels observés est celle que nous avons présentée ci-dessus : l'addition d'ions métalliques entraînerait une déformation de la bande faisant apparaître un épaulement vers 280 nm, un creux vers 245 nm et un déplacement du maximum.

On peut en effet supposer ceci en tenant compte des observations de spectres :

- Existence d'extremums vers 245 et 280 nm.
- Existence de points isobestiques vers 230 et 267 nm.
- Déplacement du maximum vers les grandes longueurs d'onde inférieur à 3-4 nm.

Il reste à savoir pourquoi ces ions déforment le spectre du DNA de la même manière et quelle est la signification de cette déformation.

Conclusion

La similitude des spectres différentiels observés avec différents ions (excepté l'ion Mg^{++}) incite à penser que ceux-ci se placent dans des sites comparables du DNA.

L'action de l'ion Mg^{++} (fig. 75) est un simple effet hypochromique.

Les autres ions envisagés modifient la forme du spectre du DNA parce qu'ils sont en interaction avec les bases de celui-ci. (fig. 72, 73, 74, 77).

Notons que, par exemple dans le cas des solutions zinciques, les caractéristiques des spectres différentiels sont les mêmes à l'état natif en 5.10^{-3} ion-g/l, en 0,1 ion-g/l et à l'état "dénaturé" en 5.10^{-3} ion-g/l (fig. 72, 73, 77). Seules leurs intensités diffèrent.

On peut difficilement, d'après ces résultats, choisir l'une des deux conclusions possibles :

- l'intensité du spectre différentiel est une fonction croissante du nombre d'ions fixés sur le même type de sites :

dans ce cas, le nombre d'ions fixés est une fonction décroissante de la force ionique (fig. 72, 73). La comparaison des spectres différentiels de DNA en présence d'ions Zn^{++} effectués à 25° C et 85° C indique que le DNA fixe un plus grand nombre d'ions à 85° C qu'à 25° C (fig. 72, 77).

Des études stoechiométriques de fixation des ions (53) ont montré qu'il en est ainsi.

- l'intensité du spectre différentiel est fonction de la nature du site. Des sites différents sur les bases du DNA induiraient des spectres de formes identiques mais d'intensités différentes.

Il est aussi possible que ces deux aspects de l'influence de la fixation des ions sur les spectres différentiels du DNA agissent simultanément.

Il est actuellement admis (51, 52) qu'en 5.10^{-3} ion-g/l, le site de fixation le plus probable pour les ions envisagés est

$$\diagdown PO^{-} - M^{++} - N_7 \diagup$$

Nous discuterons de façon plus détaillée des sites de fixation des ions tant à l'état natif qu'à l'état "dénaturé" au Ch. VIII.

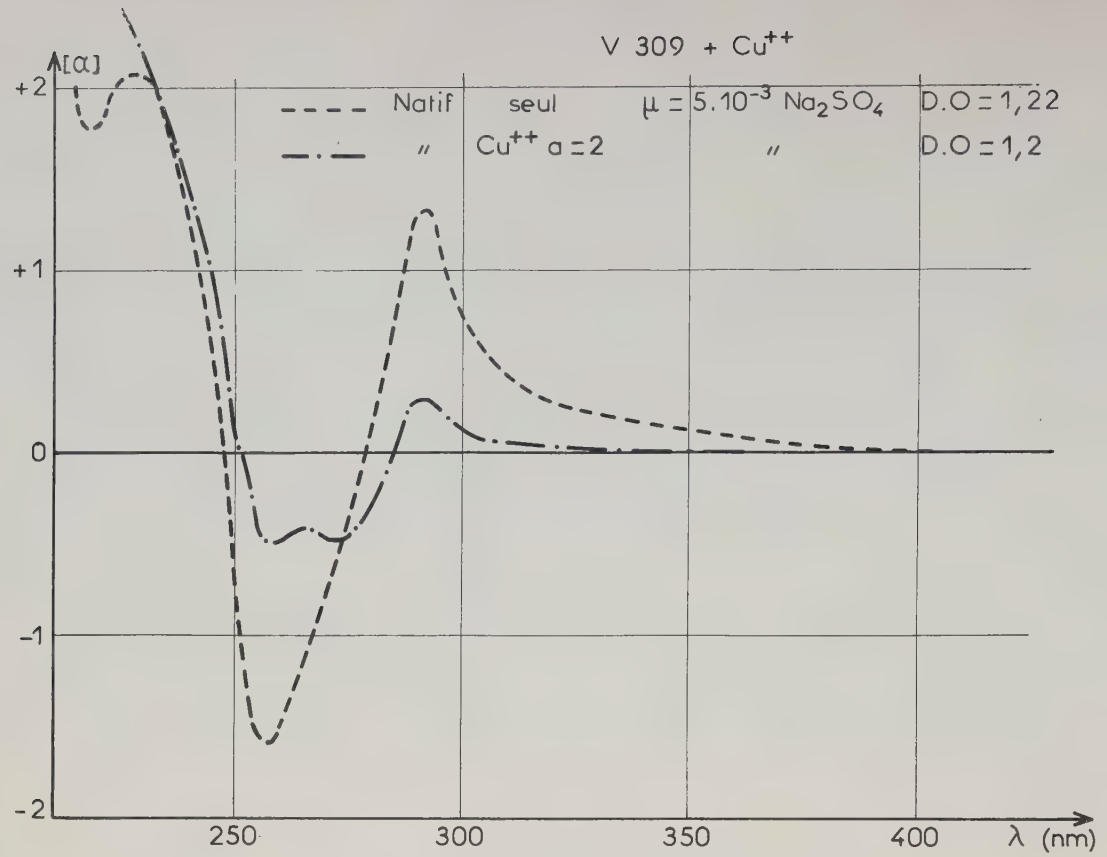

V 309 + Cu++
[α]
+2
+1
0
-1
-2
Natif seul μ = 5.10-3 Na2SO4 D.O = 1,22
" Cu++ a = 2 " D.O = 1,2
250
300
350
400
λ (nm)

Fig. 79

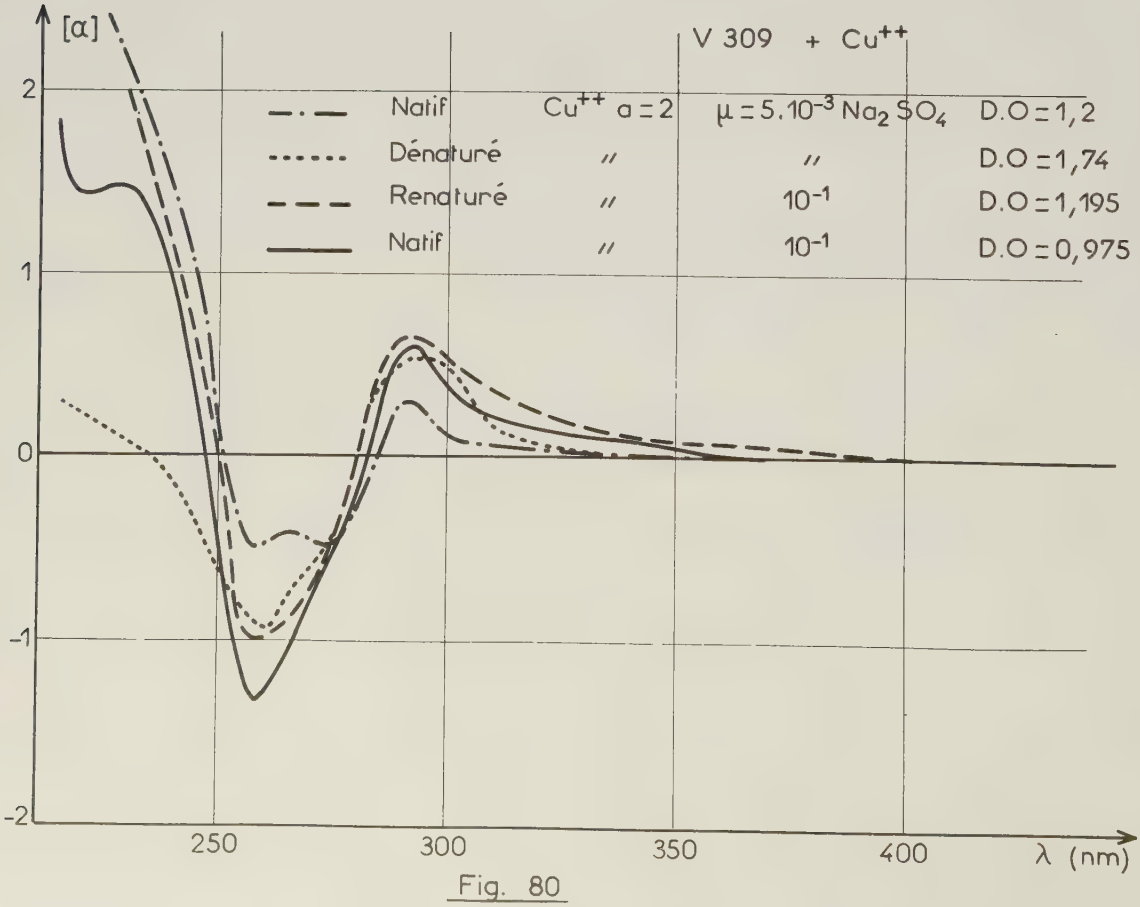

[α]
V 309 + Cu++
2
1
0
-1
-2
Natif Cu++ a = 2 μ = 5.10-3 Na2SO4 D.O = 1,2
Dénaturé " " D.O = 1,74
Renaturé " 10-1 D.O = 1,195
Natif " 10-1 D.O = 0,975
250
300
350
400
λ (nm)

Fig. 80

32) Dispersion Optique Rotatoire

Les fig.79, 80 et 81 représentent la rotation α' exprimée en degré en fonction de la longueur d'onde λ exprimée en nm.

321) D.O.R. des solutions cuivriques de DNA

La fig.79 compare la D.O.R. du DNA V 309 seul avec celle du même DNA ayant complexé des ions Cu^{++} ($a = \frac{Cu^{++}}{DNA - P} = 2$)

On observe une diminution importante des bandes vers 290 nm et 257 nm et l'apparition d'une autre bande vers 270 nm, cette bande étant partiellement masquée par les deux autres.

Si l'on compare toutes les courbes de la fig 80 à celle du DNA seul (fig.79), on peut voir que :

- La présence d'ions Cu^{++} change peu la conformation du DNA si le solvant est à la force ionique 0,1 ion-g/l.
- La "dénaturation" en présence d'ions Cu^{++} change moins la conformation du DNA que ne le font ces ions à température ordinaire dans un solvant de faible force ionique (5.10^{-3} ion-g/l).

La courbe de D.O.R. de l'état"dénaturé"ne présente pas de bande vers 270 nm.

- La "renaturation" par augmentation de la force ionique (0,1 ion-g/l) régénère un DNA de même conformation que celui qui est dissous dans le même solvant en présence d'ions Cu^{++} et qui n'a pas subi de traitement dénaturant.

322) D.O.R. des solutions zinciques de DNA

En présence d'ions Zn^{++}, la conformation du DNA est aussi fortement modifiée (fig.81). On observe un léger épaulement vers 270 - 280 nm, mais il est beaucoup moins prononcé que celui qu'on observe dans le cas des solutions cuivriques.

La "renaturation" régénère bien le DNA initial contenant la même quantité d'ions Zn^{++}.

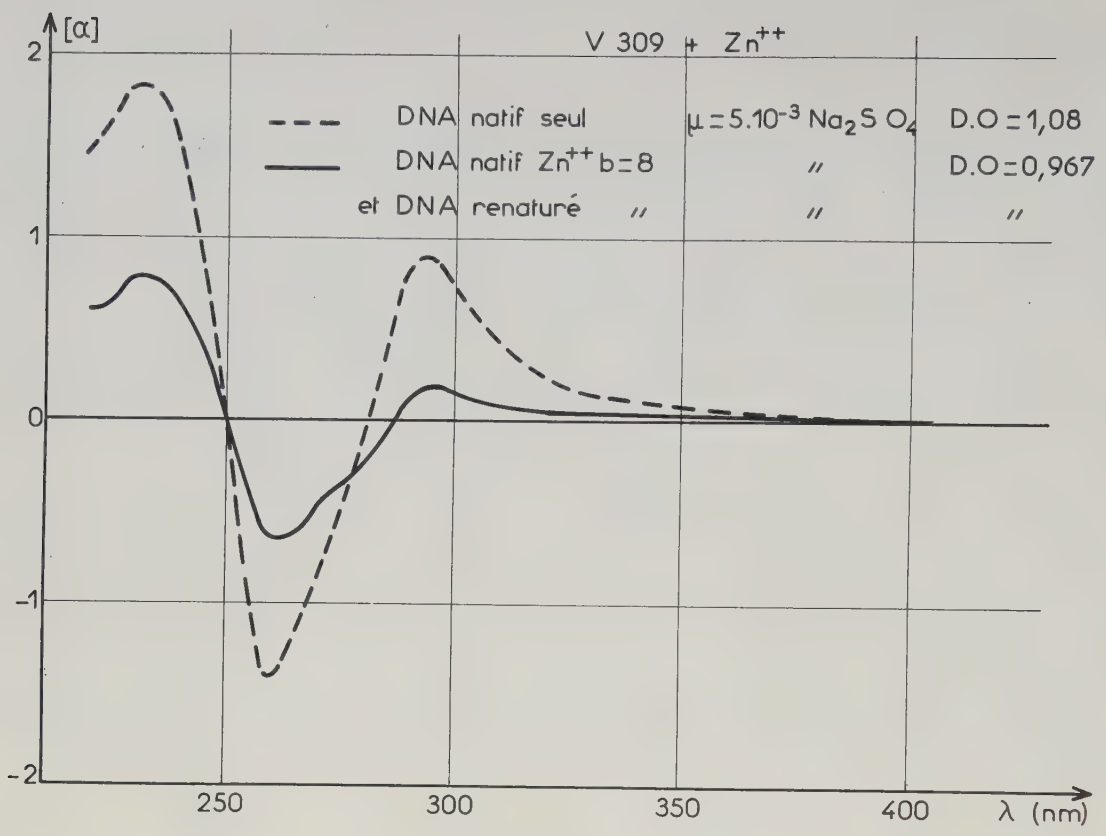


Fig. 81

33) *Dichroïsme Circulaire*

331) Résultats

La fig.82 représente les spectres dichroïques du DNA V 309 seul, puis en présence d'ions Zn^{++} ($b = \frac{Zn^{++}}{DNA - P} = 8$; $\mu = 5.10^{-3}$ ion-g/l $Na_2 SO_4$), en présence d'ions Cu^{++} ($a = \frac{Cu^{++}}{DNA - P} = 2$; $\mu = 0,15$ ion-g/l $Na_2 SO_4$) et ($a = 2$, $\mu = 5.10^{-3}$ ion-g/l). Au fur et à mesure qu'on passe de la première solution indiquée ci-dessus à la dernière, on voit l'intensité de la bande dichroïque vers 270 nm diminuer et le maximum se déplacer de 273 à 283 nm environ. Il apparait en outre un épaulement vers 265 nm en présence d'ions Cu^{++} en faible force ionique.

La fig. 83 montre qu'en présence d'ions Cu^{++}, le spectre dichroïque de l'état"dénaturé"est plus proche de celui du DNA natif seul que celui de l'état natif contenant la même quantité d'ions Cu^{++} dans un solvant de faible force ionique.

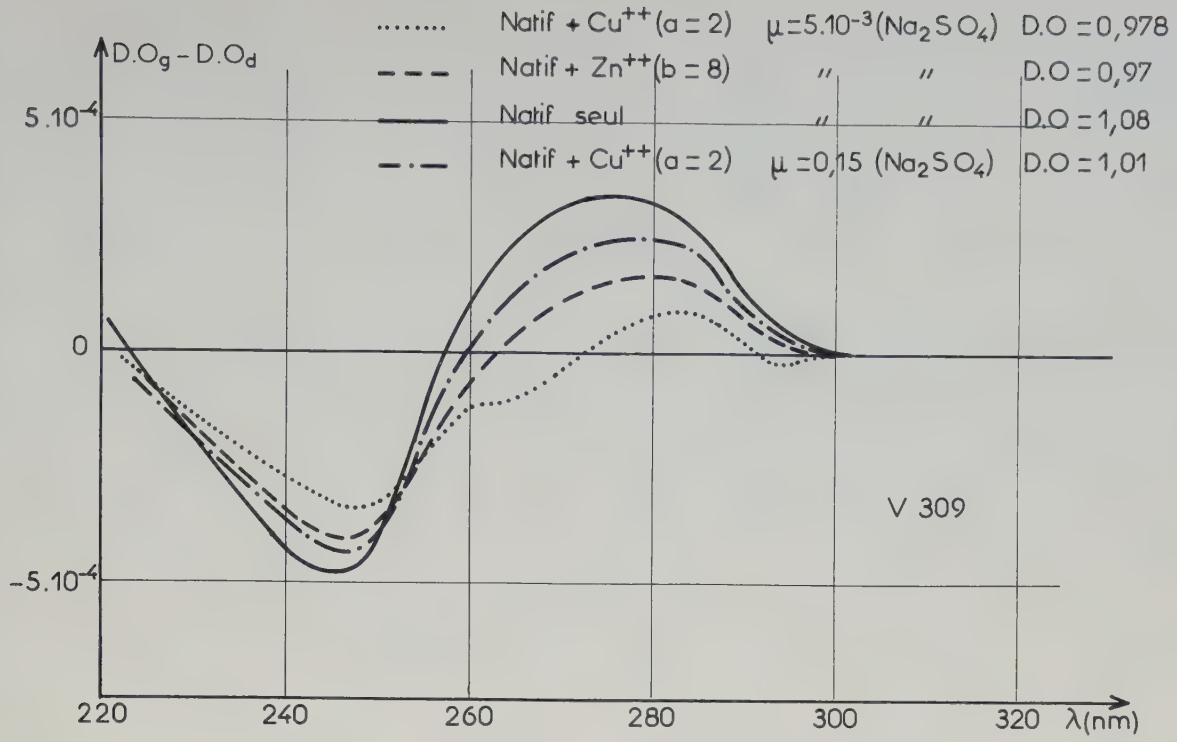

D.Og – D.Od
5.10⁻⁴
0
-5.10⁻⁴
220
240
260
280
300
320
λ(nm)
..... Natif + Cu++ (a = 2) μ=5.10⁻³(Na2SO4) D.O = 0,978
– – – Natif + Zn++ (b = 8) " " D.O = 0,97
——— Natif seul " " D.O = 1,08
—·— Natif + Cu++ (a = 2) μ = 0,15 (Na2SO4) D.O = 1,01
V 309

Fig. 82

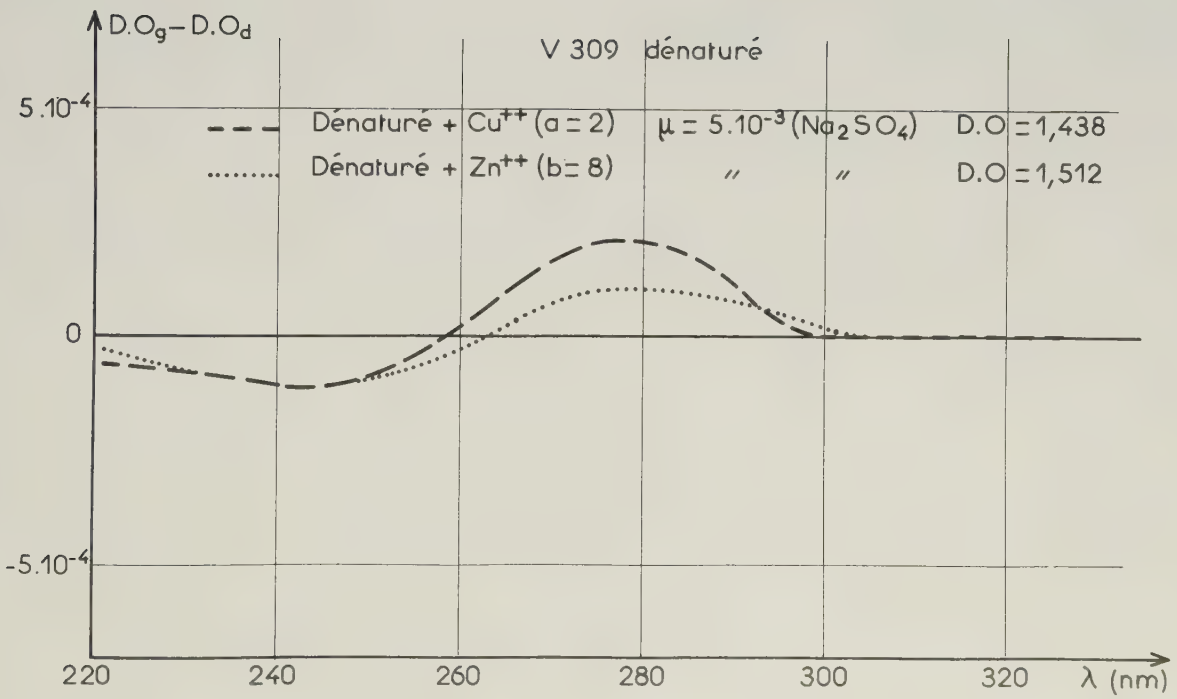

D.Og – D.Od
V 309 dénaturé
5.10⁻⁴
0
-5.10⁻⁴
220
240
260
280
300
320
λ (nm)
– – – Dénaturé + Cu++ (a = 2) μ = 5.10⁻³(Na2SO4) D.O = 1,438
..... Dénaturé + Zn++ (b = 8) " " D.O = 1,512

Fig. 83

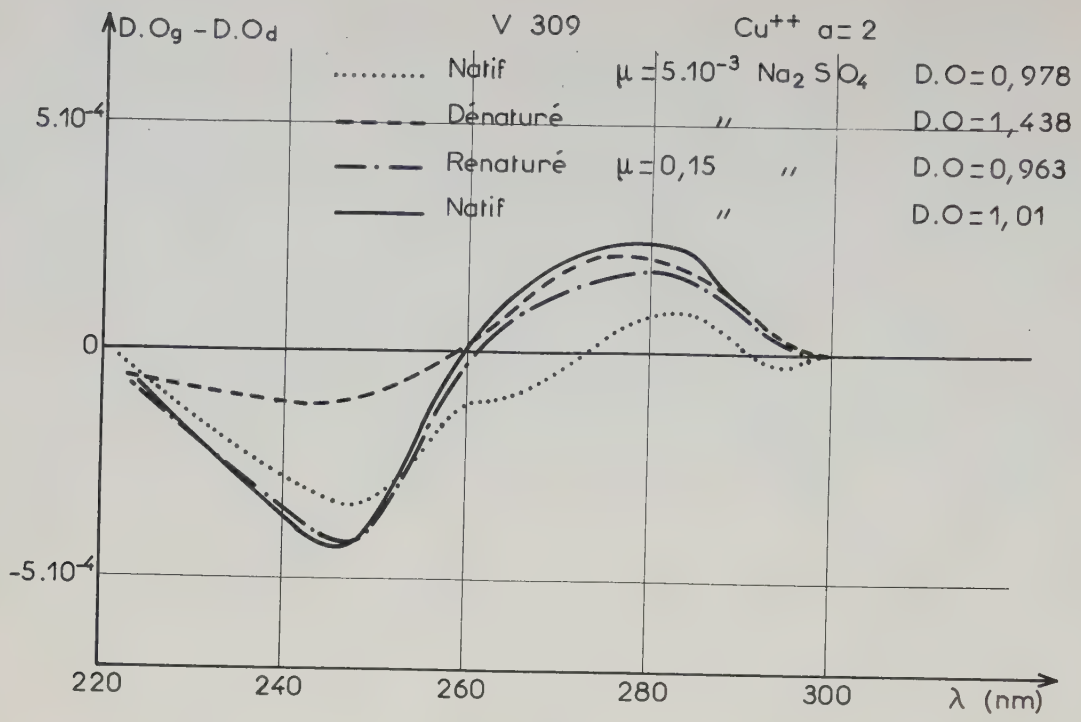

D.Og - D.Od
V 309
Cu++ a = 2
Natif
μ = 5.10-3 Na2 SO4
D.O = 0,978
Dénaturé
"
D.O = 1,438
Renaturé
μ = 0,15
"
D.O = 0,963
Natif
"
D.O = 1,01
5.10-4
0
-5.10-4
220
240
260
280
300
λ (nm)

Fig. 84

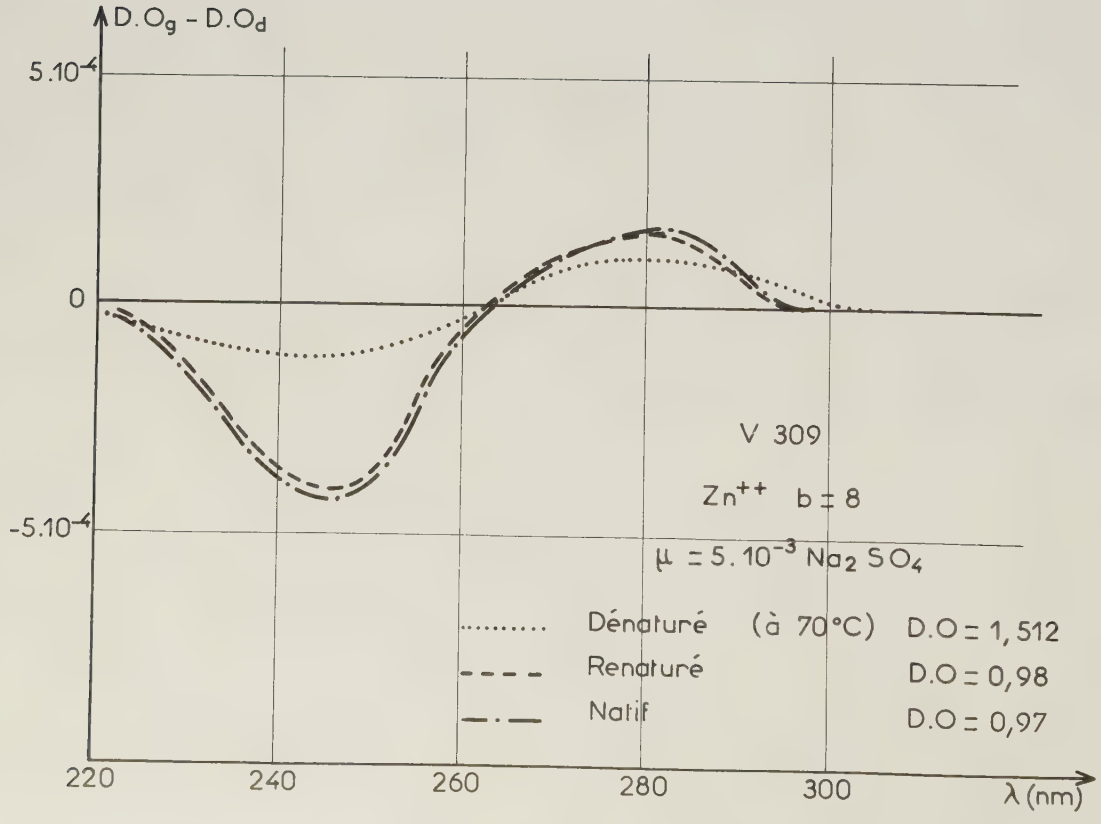

D.Og - D.Od
5.10-4
0
-5.10-4
V 309
Zn++ b = 8
μ = 5.10-3 Na2 SO4
Dénaturé (à 70°C)
D.O = 1,512
Renaturé
D.O = 0,98
Natif
D.O = 0,97
220
240
260
280
300
λ (nm)

Fig. 85

Les fig. 84 et 85 montrent, comme dans le cas de l'étude par D.O.R. que la "renaturation" des solutions cuivriques et zinciques régénère le DNA initial de même force ionique et contenant la même quantité d'ions Cu^{++}.

332) Discussion

Les résultats des mesures de D.C. sur les solutions de DNA en présence d'ions cuivriques et zinciques confirment les résultats de D.O.R.

Malheureusement, ils ne sont que qualitatifs : ils illustrent des changements tant structuraux (conformations différentes) que spectraux. On ne connait pas actuellement de règle générale d'évolution de l'allure des spectres de D.C. en fonction des paramètres structuraux et électroniques (28).

La contribution apportée par l'élaboration de ces spectres deviendra intéressante lorsqu'une théorie satisfaisante saura les expliquer.

Dans le cadre de nos études sur l'évolution des systèmes, ils nous indiquent que :

- les ions interagissent avec les bases du DNA.
- les "renaturations" régénèrent les DNA conformément à la structure qu'ils avaient avant le traitement dénaturant.

4) *CONCLUSION*

Ayant exposé en détail les résultats relatifs à chaque technique utilisée ainsi que les conclusions qu'on peut en tirer, nous pouvons maintenant rassembler ces résultats et conclusions afin d'en faire la synthèse.

Une première approche de l'étude des mécanismes de "renaturation" de DNA en présence d'ions Cu^{++} et Zn^{++} a donc comporté la mise en évidence de la fixation des ions sur le DNA, la comparaison des quantités respectives d'ions fixés à l'état natif et à l'état "dénaturé" ainsi que celle des conformations correspondantes du DNA et enfin la mise en évidence du départ progressif des ions au cours de la "renaturation".

Nous devons cependant remarquer que les techniques utilisées pour étudier les interactions DNA - Cu^{++} à l'état statique, nécessitent l'emploi de solutions de DNA dont la densité optique est au moins égale à 1.

L'étude du paramètre concentration en DNA à rapport a constant (Ch. III - 2) montre que l'augmentation de la concentration en DNA provoque un ralentissement des "renaturations". Il ne semble pas qu'on puisse l'expliquer par l'augmentation de la viscosité des solutions. Une explication possible serait, comme le propose ROPARS (37) que des pontages interchaînes assurés par des ions Cu^{++} puissent se produire dès que la concentration est élevée. Il serait alors à craindre que les systèmes étudiés à l'état statique soient différents de ceux dont nous avons suivi l'évolution.

- Chapitre VI -

ROLE DE L'AGENT RENATURANT DES SOLUTIONS CUIVRIQUES

On sait que la "renaturation" des solutions cuivriques de DNA est déclenchée par augmentation de la force ionique. On peut penser que l'action de la force ionique a pour conséquence la décomplexation des ions Cu^{++} fixés sur le DNA. Ces ions Cu^{++} seraient ceux qui maintiennent l'état dénaturé après refroidissement de la solution.

S'il en est ainsi, la "renaturation" peut aussi être amorcée par action de l'EDTA, complexant fort des ions Cu^{++}. HIAI (16) affirme qu'il en est ainsi et que la "renaturation" est instantanée et presque complète. Il ne donne pas d'indications quantitatives à ce sujet. Pour notre part, nous avons entrepris des expériences dans ce sens.

1) *RESULTATS*

Nous avons utilisé du DNA V 371 dans les conditions expérimentales habituelles (Ch.II - V).

11) *Action de l'EDTA sur le DNA natif sans Cu^{++}*

La densité optique diminue dans les proportions de la dilution provoquée par l'addition d'EDTA.

L'EDTA n'a pas d'action sur le DNA seul.

12) *Action de l'EDTA sur les ions Cu^{++} seuls*

Il y a formation d'un complexe coloré présentant une large bande dans l'U.V. entre 270 et 230 nm. A 260 nm, la D.O.=0,245 si $[Cu^{++}] = 10^{-4}$ M et $[EDTA] < 10^{-4}$ M.

13) *Action de l'EDTA sur le DNA natif en présence d'ions Cu^{++}*

DNA + Cu^{++} (10^{-4} M)	D.O. = 0,2555
DNA + Cu^{++} (10^{-4} M) + EDTA $\sim$ 10^{-4} M	D.O. = 0,5552

D'où D.O. du DNA : 0,5552 - 0,245 = 0,3102.
Soit un effet hyperchromique h $\sim$ 1,35.

La complexation des ions Cu^{++} par l'EDTA a donc provoqué une "dénaturation" instantanée du DNA. L'augmentation de la force ionique de cette solution dénaturée jusqu'à $\mu \sim 0,1$ ion-g/l fait décroître la densité optique en quelques minutes jusqu'à un effet hyperchromique h $\sim$ 1,19. La "renaturation" dans ces conditions n'est que partielle : c'est une action de la force ionique sur le DNA seul (les Cu^{++} sont complexés). Nous constatons qu'une telle action n'est pas instantanée. Nous soulignons la nécessité de la présence d'ions Cu^{++} fixés sur le DNA pour que la "renaturation" puisse être menée à bien de façon totale.

14) *Action de l'EDTA sur le DNA dénaturé en présence d'ions Cu^{++}*

Instantanément, l'effet hyperchromique atteint est h $\sim$ 1,3.

L'action d'une force ionique $\mu \sim 0,1$ ion-g/l conduit en quelques minutes à une "renaturation" partielle, l'effet hyperchromique étant

h $\sim$ 1,08.

Ces résultats sont comparables à l'action de l'EDTA sur les solutions cuivriques de DNA n'ayant pas subi de traitement dénaturant.

2) CONCLUSION

L'initiation de la "renaturation" n'est non seulement pas due au départ des ions Cu^{++}, mais encore, ceux-ci sont nécessaires pour assurer une "renaturation" totale du DNA.

La force ionique semble agir sur la structure du DNA, probablement par effet électrostatique.

Les ions Cu^{++} fixés sur le DNA en faible force ionique affaiblissent considérablement la structure de celui-ci. Leur retrait brutal aggrave l'état de désordre qu'ils ont initié, même à température ambiante. Cependant la "renaturation" totale est possible grâce aux pontages qu'ils assurent.

L'initiation de la "renaturation" est probablement due à la fois au départ de certains ions Cu^{++}, à la stabilisation électrostatique de la double hélice et au maintien des deux brins complémentaires à proximité l'un de l'autre par des pontages à l'aide d'ions Cu^{++}.

Aboutir à une telle conclusion, c'est supposer qu'il ne se forme pas un complexe ternaire DNA - Cu - EDTA qui maintiendrait l'état dénaturé. Il faudrait déterminer la constante d'association des ions Cu^{++} avec le DNA à l'état dénaturé et voir si elle est du même ordre de grandeur que celle des ions Cu^{++} avec l'EDTA. S'il en est ainsi, l'existence du complexe ternaire est probable.

- Chapitre VII -

DETERMINATION D'UNE FONCTION $\alpha = \varphi(t)$

L'étude phénoménologique précédente a donné les courbes d'évolution $\alpha = \varphi(t)$ et les lois $\text{Log } k_{p_i} = f(p_i)$. On peut comparer les courbes d'évolution de différents systèmes et par conséquent les classer en groupes de systèmes possédant la même courbe d'évolution $\alpha = \varphi(t)$.

Nous pouvons difficilement tirer des conclusions au sujet des "renaturations" des solutions zinciques de DNA par rapport à celles des solutions cuivriques : en effet, la transformation n'est pas isotherme. Nous ne pouvons pas non plus attacher une trop grande importance aux courbes de "renaturation" de DNA bactériens non centrifugés puisque la centrifugation semble séparer une fraction capable de modifier leur évolution.

Par conséquent, le point important est l'obtention du même type de courbe $\alpha = \varphi(t)$ d'évolution du DNA de thymus de veau et des DNA de E. Coli et H. Influenzae centrifugés. C'est ce que nous avons convenu d'appeler "systèmes équivalents".

Donner une courbe d'évolution est une façon de décrire l'évolution d'un système. Trouver une équation qui représente sa loi d'évolution est une façon complémentaire de le faire.

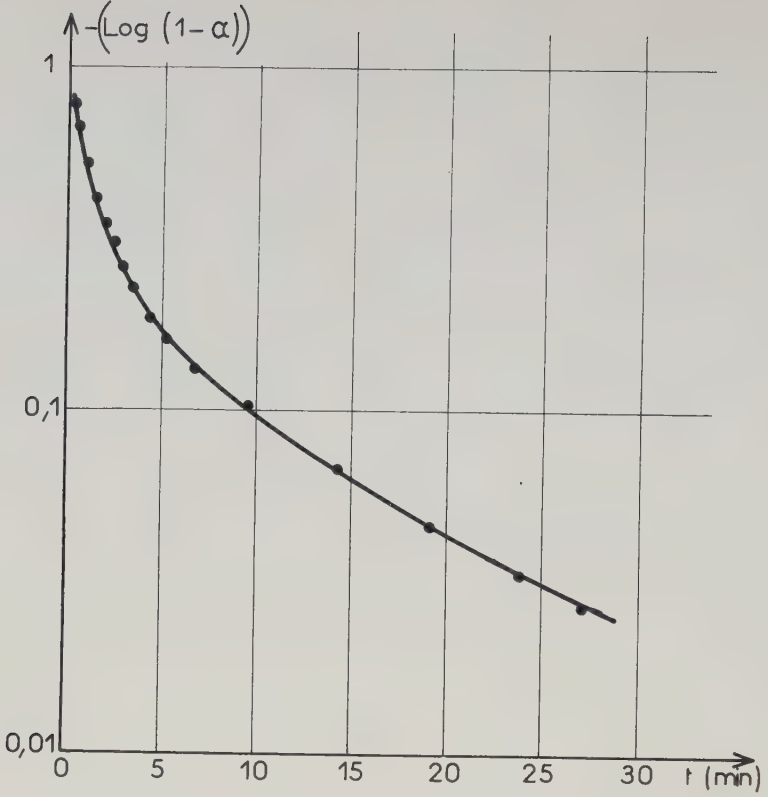

-(Log (1-α))
1
0,1
0,01
0
5
10
15
20
25
30
t (min)

Fig. 22

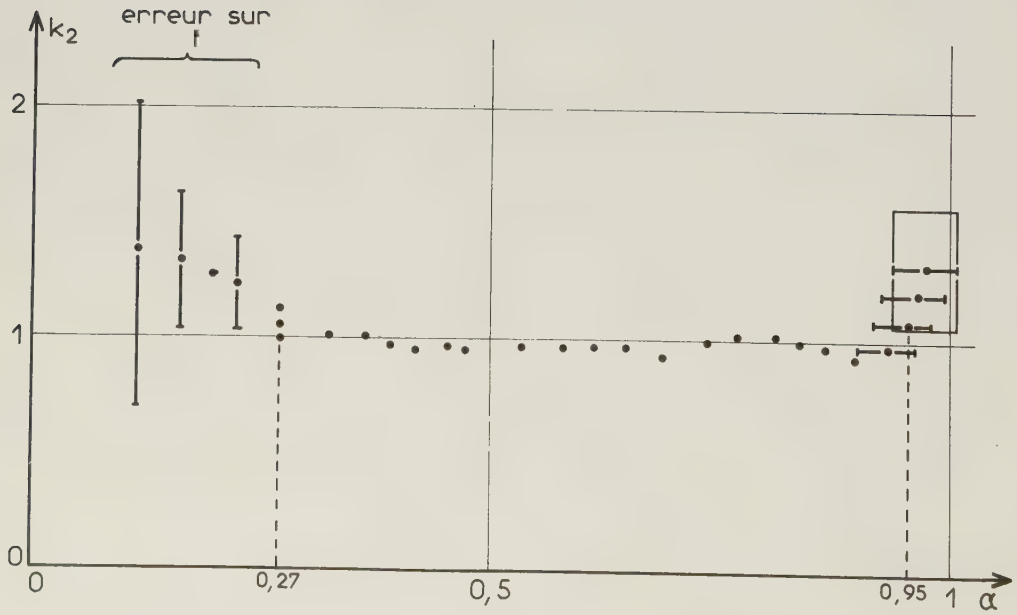

k2
erreur sur
t
2
1
0
0
0,27
0,5
0,95
1
α

Fig. 23

La méthode classique de paramétrage d'une courbe cinétique est la recherche de l'ordre de la réaction.

Les équations donnant les ordres de réaction sont :

$$k_1 t = - \text{Log} (1 - \alpha) \quad \text{pour } n = 1$$

$$k_n t = \frac{1}{n - 1} \left[(1 - \alpha)^{1-n} - 1 \right] \quad \text{pour } n \neq 1$$

Analysons la courbe d'évolution du DNA V 309 :

La Fig. 22 montre que l'ordre 1 est exclu. Le tableau III dans lequel sont réunies les valeurs de t, α et k_n pour différentes valeurs de n montre que la valeur n = 2 laisse pratiquement k_2 constant lorsque α est compris entre 0,32 et 0,93.

Nous avons représenté sur la Fig. 23, k_2 en fonction de α. Lorsque t est petit, l'imprécision sur la détermination de l'origine de l'échelle des temps est telle que l'écart à la valeur moyenne de k_2 dans cette zone n'est pas supérieur à l'erreur $\frac{\Delta k_2}{k_2}$ due à la seule erreur $\frac{\Delta t}{t}$.

De même pour les grandes valeurs de α, l'erreur sur α entraîne une erreur sur k_2 telle qu'on peut aussi conclure que k_2 est à peu près constant dans cette zone.

Nous avons aussi testé la validité de l'ordre 2 en calculant α à partir de la valeur la plus probable de $k_2 = 0,97$. On peut voir (Fig. 23 bis) que la courbe $\alpha' = \psi(\log t)$ obtenue ne s'écarte pas au-delà des erreurs expérimentales de la courbe $\alpha = \psi(\log t)$ initiale.

On peut donc représenter les courbes obtenues par une fonction

$$\alpha = \frac{1}{\frac{1}{k_2 t} + 1}$$

Etant donnée la faible précision sur k_2 due à l'erreur sur la détermination de l'origine de l'échelle des temps, on ne peut en fait rien dire tant que $\alpha < 0,32$. Il ne serait donc pas raisonnable d'attacher à un tel pa-

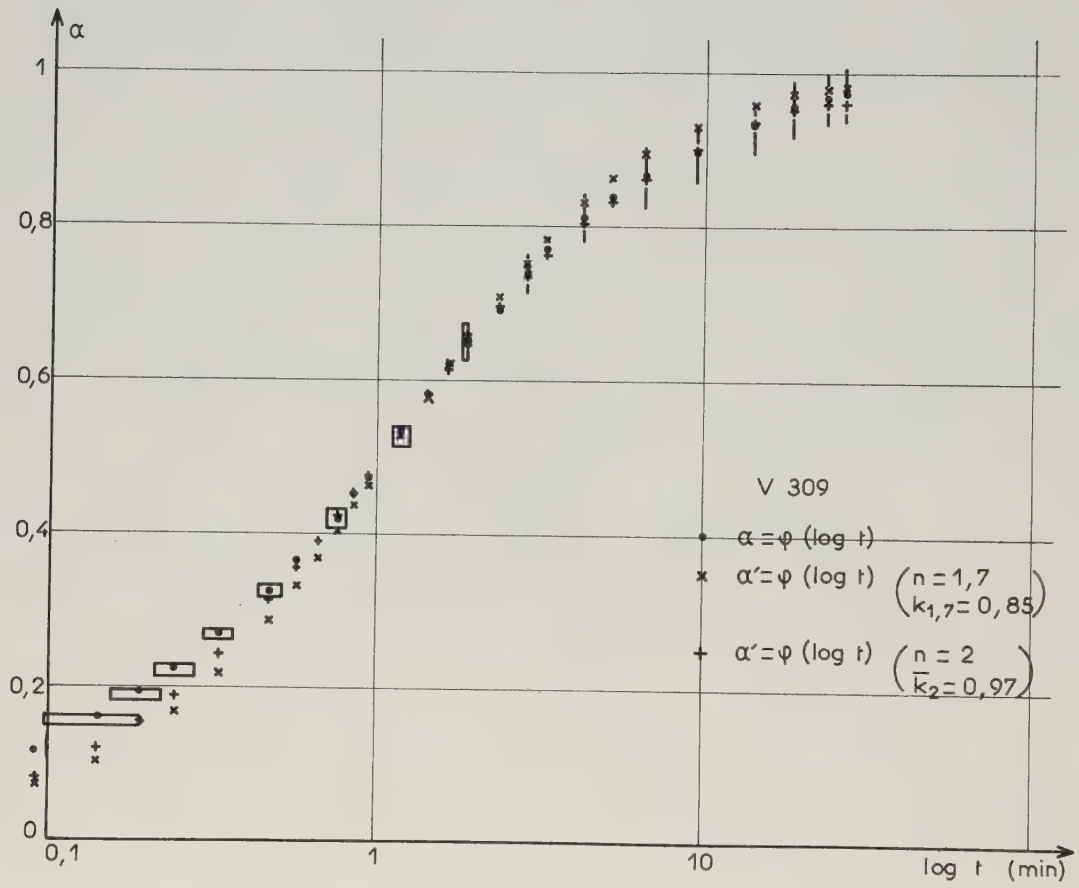

α
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
log t (min)
V 309
α = φ (log t)
α' = φ (log t) (n = 1,7 k1,7 = 0,85)
α' = φ (log t) (n = 2 k2 = 0,97)

Fig. 23 bis

Tableau III

t_{min}	α	$k_{2,5}$ (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	α'	$k_{1,8}$ (min^{-1})	- k
0,094	0,115	2,32	1,38	0,08	1,46	1,38
0,14	0,162	1,43	1,33	0,12	1,32	1,26
0,19	0,196	1,37	1,27	0,155	1,27	1,22
0,24	0,223	1,28	1,23	0,189	1,17	1,22
0,33	0,270	1,21	1,14	0,243	1,09	1,28
0,47	0,324	1,13	1,02	0,314	0,98	
0,57	0,365	1,15	1,02	0,356	0,98	1,28
0,66	0,392	1,12	0,97	0,390	0,93	1,18
0,76	0,419	1,10	0,95	0,424	0,90	1,18
0,85	0,453	1,15	0,97	0,453	0,90	1,28
0,94	0,473	1,14	0,95	0,476	0,90	1,23
1,18	0,534	1,21	0,97	0,531	0,90	1,39
1,42	9,581	1,32	0,97	0,581	0,87	1,28
1,65	0,615	1,28	0,97	0,616	0,87	1,30
1,89	0,649	1,34	0,97	0,645	0,87	1,27
2,36	0,689	1,35	0,93	0,695	0,82	1,24
2,83	0,737	1,51	0,99	0,735	0,85	1,28
3,30	0,770	1,63	1,02	0,763	0,85	1,26
4,25	0,811	1,75	1,02	0,805	0,82	1,25
5,19	0,838	1,84	0,99	0,833	0,79	1,24
6,60	0,865	1,94	0,97	0,861	0,74	1,22
9,44	0,897	2,06	0,93	0,900	0,69	1,18
14,16	0,932	2,61	0,97	0,935	0,66	1,18
18,88	0,953	3,43	1,08	0,952	0,69	1,19
23,6	0,966	4,23	1,21	0,96	0,77	1,22
26,9	0,973	5,55	1,33	0,96	0,79	1,22

ramétrage une grande importance et, par conséquent, de conclure à un mécanisme bimoléculaire éventuel.

On pourrait en effet paramétrer également les courbes expérimentales par une équation empirique telle que :

$$\alpha^2 = \frac{1}{1 + (\frac{A}{t})^k}$$

Lorsque $t \rightarrow 0$ $\quad \alpha \rightarrow 0$

$t \rightarrow \infty$ $\quad \alpha \rightarrow 1$

Le facteur qui multiplie t est $(\frac{1}{A})^k$.

Il faut alors déterminer A et k. On peut déterminer k par une méthode graphique en portant $\text{Log} \left(\frac{1}{\alpha^2} - 1 \right) = f(\text{Log } t)$. Si l'on obtient une droite, k est la pente de la droite, et A est l'ordonnée à l'origine de cette droite. Les valeurs de k portées sur le tableau III montrent que k est constant, les écarts à la valeur moyenne étant moins grands que ceux de k_2.

De telles équations font apparaître un facteur multiplicatif du temps, ce qui est en accord avec la vérification de la règle phénoménologique.

Conséquences

Il est possible de paramétrer une partie de la courbe d'évolution à l'aide d'une équation du second ordre, mais nous avons montré qu'on pouvait trouver une autre équation. Par conséquent, cette démarche ne permet pas de conclure au sujet du mécanisme mais elle indique qu'un mécanisme bimoléculaire est possible.

Nous avons ainsi résumé les conclusions qui découlent de l'étude phénoménologique. Nous allons montrer que l'étude des mécanismes est complémentaire de celle de la phénoménologie.

- Chapitre VIII -

MODELES ET MECANISME

La comparaison de l'évolution structurale du DNA en présence de certains ions métalliques d'une part, et en leur absence d'autre part, souligne l'importance du rôle joué par ces ions. Or, nous avons montré (Ch. V) que ces ions pouvaient se fixer sur le DNA. Le mécanisme de transformation du DNA en présence d'ions tels que Cu^{++} ou Zn^{++}, est donc probablement lié à différents modes de fixation des ions sur la macromolécule de DNA.

Les déductions de l'analyse phénoménologique des cinétiques de "renaturation" du DNA d'une part, et d'augmentation de la quantité d'ions Cu^{++} libres au cours de cette transformation, d'autre part, ont conduit à définir deux sous-systèmes couplés.

L'élaboration de modèles doit nous permettre de définir les différents états d'équilibre du système total, c'est-à-dire de l'un et l'autre sous-système. Ceci étant fait, on pourra imaginer un mécanisme de passage d'un état d'équilibre vers un autre état d'équilibre.

Nous allons tout d'abord décrire les modèles puis nous les justifierons à l'aide de l'ensemble des résultats expérimentaux actuellement connus.

Les différents états d'équilibre du système peuvent être appelés :

. DNA natif en force ionique 5.10^{-3} ion-g/l en présence d'un excès d'ions Cu^{++} ou Zn^{++} par rapport à la concentration en DNA exprimée en DNA-P/l.

. DNA "dénaturé" dans le même solvant que précédemment.

. DNA "renaturé" en force ionique 5.10^{-3} ion-g/l en présence d'ions Zn^{++}

. DNA "renaturé" en force ionique 0,1 ion-g/l en présence d'ions Cu^{++}.

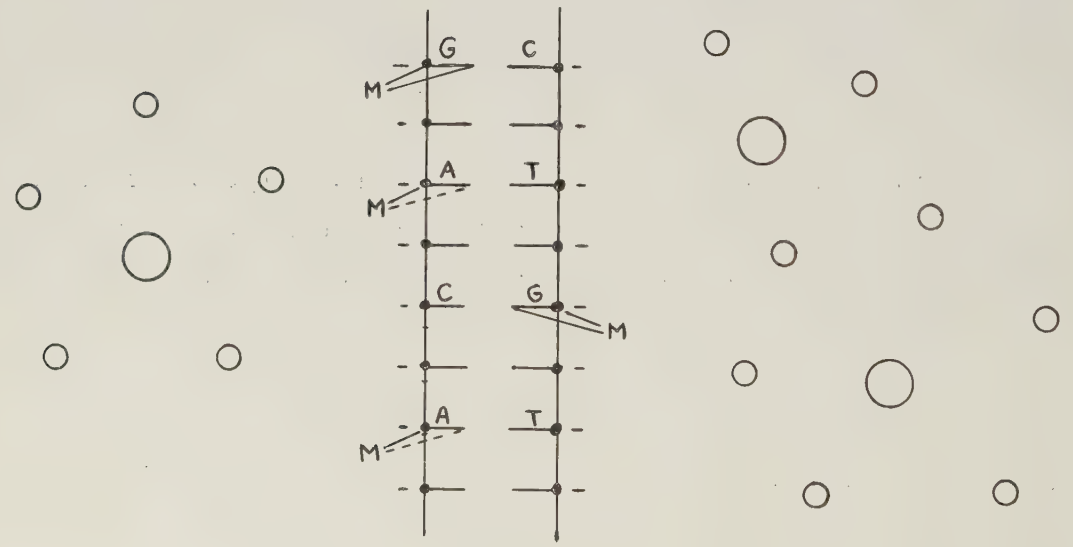
1) *DESCRIPTION DES MODELES DANS LES DIFFERENTS ETATS D'EQUILIBRE*

11) *DNA natif (5.10^{-3} ion-g/l) en présence d'ions Cu^{++} ou Zn^{++} (M^{++})*

Le DNA est en double hélice de WATSON et CRICK.

Les ions Cu^{++} ou Zn^{++} forment des pontages entre les phosphates et l'N_7 soit de l'adénine soit de la guanine du DNA.

Des ions M^{++} libres sont dans le solvant en présence d'ions Na^{+}.

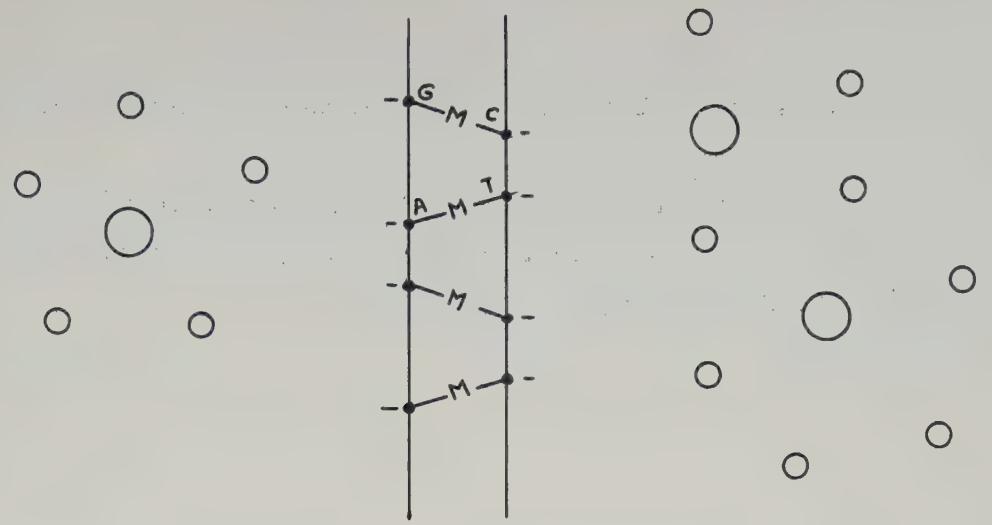


M^{++} ○

Na^{+} ○

Afin de simplifier les schémas nous n'indiquerons pas les anions SO_4^{--}.

12) *DNA "dénaturé" (5.10^{-3} ion-g/l)*



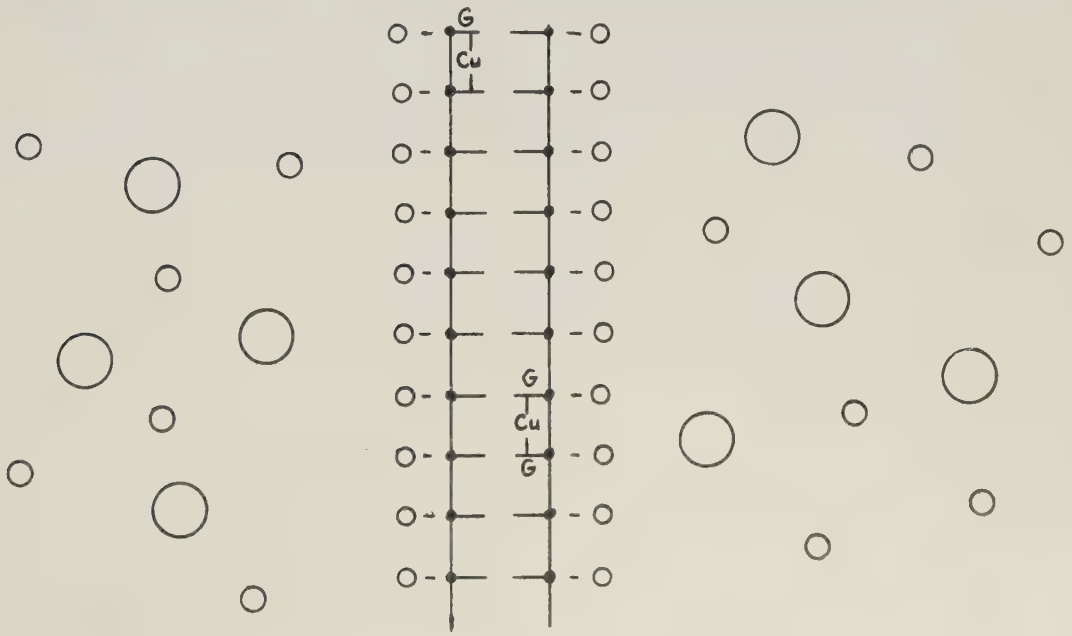
Les deux brins du DNA ne sont pas séparés, mais la double hélice a subi une distorsion par rapport à l'état natif.

Les ions Cu^{++} sont entre les bases complémentaires G-C ou A-T. Celles-ci ne sont pas parallèles entre elles. Des ions M^{++} sont libres dans le solvant.

13) *DNA "renaturé" (5.10^{-3} ion-g/l) en présence d'ions Zn^{++}*

Le modèle est identique à celui du DNA natif.

14) *DNA "renaturé" (0,1 ion-g/l) en présence d'ions Cu^{++}*



Une faible proportion d'ions Cu^{++} est fixée entre des guanines adjacentes (47-48).

Les ions Cu^{++} libres sont plus nombreux que dans le cas précédent.

La concentration locale d'ions Na^{+} autour du polyélectrolyte qu'est le DNA est élevée. Par conséquent, la force ionique du solvant doit être réellement inférieure à 0,1 ion-g/l.

2) *JUSTIFICATION DES MODELES*

21) *DNA natif (5.10^{-3} ion-g/l)*

Les ions Cu^{++} ou Zn^{++} se fixent sur le DNA en force ionique 5.10^{-3} ion-g/l : le nombre de sites de fixation est n = 0,5 M^{++}/P (53).

Ce nombre de sites est le même pour les ions Ca^{++} et Mg^{++} et il est indépendant de la nature du DNA, c'est-à-dire des proportions de paires A-T ou G-C (53).

L'étude de la fixation des ions sur le DNA (Ch. V) indique qu'expérimentalement on peut mettre en évidence deux sortes de sites : les phosphates (52-53) et les bases (16, 37, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50) :

En effet, si on ajoute des ions Zn^{++} à une solution de DNA dissous en 5.10^{-3} M $NaClO_4$, cette addition s'accompagne d'une libération d'ions Na^+ (53). Les ions Na^+ étant des ions compensateurs, les ions Zn^{++} qui prennent leur place se fixent donc aussi sur les phosphates afin d'y jouer le même rôle. Il est probable qu'il en est de même pour les ions Cu^{++}, mais la preuve expérimentale n'en a pas encore été donnée.

La spectrophotométrie différentielle, la dispersion optique rotatoire et le dichroïsme circulaire indiquent par ailleurs que les ions Cu^{++} ou Zn^{++} se fixent sur les bases du DNA.

L'abaissement du point de fusion du DNA est une fonction croissante de son pourcentage en G-C (16).

Ce que nous venons d'énoncer résume les connaissances reposant sur des données expérimentales. Cherchons maintenant les sites de fixation compatibles avec toutes ces données.

Si nous tenons compte à la fois de la fixation des ions sur les phosphates et sur les bases du DNA, et du nombre de sites n = 0,5 M^{++}/P , nous pouvons imaginer le mode de fixation :

$$\gtrless PO^- - M^{++} \cdots N_7(\text{guanine}) \qquad (52\text{-}53\text{-}54)$$

$$\gtrless PO^- - M^{++} \cdots N_7(\text{adénine})$$

En résumé, nous imaginons le DNA sous forme d'un polyélectrolyte en double hélice de WATSON et CRICK autour duquel il existe une concentration très élevée en M^{++}. Les ions M^{++} libres sont en équilibre avec les ions M^{++} liés.

22) *DNA "dénaturé" (5.10^{-3} ion-g/l)*

Nous avons montré (Ch. V) que les ions Cu^{++} et Zn^{++} se fixent sur les bases du DNA "dénaturé".

Le dosage des ions Cu^{++}, par voie électrochimique avant et après "renaturation"du DNA, indique que le rapport des activités finale et initiale $(\gamma c_{Cu^{++}})_2/(\gamma c_{Cu^{++}})_1$ vaut environ 1,35 (Ch. III-3).

Si l'on sait que le DNA ne fixe qu'une quantité très faible de Cu^{++} en force ionique 0,1 M (47-48) et si on confond activité et concentration parce que la solution est assez diluée :

$$(\gamma c_{Cu^{++}})_2 \sim 10^{-4} \text{ M} \quad \text{d'où}$$

$$(\gamma c_{Cu^{++}})_1 \sim 0{,}75.10^{-4} \text{ M}$$

La quantité d'ions Cu^{++} libérée est donc environ :

$$(\gamma c_{Cu^{++}})_2 - (\gamma c_{Cu^{++}})_1 = 0{,}25.10^{-4} \text{ M}$$

La concentration en DNA étant de 4 à 5.10^{-5} DNA-P/l, il y a, au cours de la "renaturation" du DNA, libération de 1 ion Cu^{++} pour 2 P, soit le même nombre d'ions Cu^{++} fixés que sur le DNA natif en faible force ionique.

Il n'est pas utile de préciser que ces ions Cu^{++} libérés étaient fixés sur le DNA "dénaturé".

Ayant montré que les ions Cu^{++} étaient fixés et les ayant dosés, il faut préciser leur mode de fixation ainsi que la structure du DNA correspondante.

Sachant qu'en l'absence d'ions Cu^{++} ou Zn^{++} il est impossible de "renaturer" totalement du DNA de thymus de veau, par exemple, il faut admettre que ces ions peuvent, à l'occasion de l'ouverture de la chaîne par chauffage, assurer des pontages entre les deux brins du DNA (54). Le rôle de ces pontages serait de maintenir les deux brins complémentaires à proximité l'un de l'autre. Le dosage indiquant qu'en moyenne chaque paire de base fixe un ion, on est amenés à penser qu'un ion est effectivement situé entre chacune des bases

complémentaires afin d'empêcher la séparation des deux brins de DNA : la double hélice serait simplement déformée.

Nous allons montrer (Ch. VIII-3) que l'évolution du sous-système constitué par les ions Cu^{++} est la cause de la "renaturation" du DNA. La libération des ions Cu^{++} étant lente (Ch. III-3), le raisonnement exposé au (Ch. IV-2) permet de conclure que la "renaturation" du DNA est beaucoup plus rapide. Ceci implique aussi que les deux brins du DNA ne soient pas séparés.

23) *DNA "renaturé" (0,1 ion-g/l)*

Les mesures optiques (Ch. III, Ch. V) montrent que le DNA "renaturé" est identique au DNA natif. En d'autres termes le DNA est en double hélice de WATSON et CRICK.

La proportion d'ions Cu^{++} fixés sur le DNA est très faible (47-48), et, en contre-partie le nombre d'ions Cu^{++} libres est plus grand que dans les cas envisagés précédemment.

Par contre la concentration en ions Na^{+} est probablement très élevée au voisinage du DNA. En effet, ceci est déduit du dosage des ions Cu^{++} par une méthode électrochimique, au cours de la "renaturation" du DNA. Nous avons alors remarqué qu'une dérive du potentiel de l'électrode de mesure avait lieu en présence de DNA en force ionique de l'ordre de 0,1 ion-g/l. Au contraire en l'absence de DNA, cette dérive ne se produit pas en force ionique élevée, mais seulement en faible force ionique. Par conséquent, tout se passe, en présence de DNA, comme si la force ionique apparente était faible.

3) *Mécanisme*

Bien que, pour des raisons de clarté, les modèles et le mécanisme soient décrits séparément leur justification repose évidemment sur les mêmes données expérimentales.

Nous avons, en effet, déjà montré que le DNA peut être "renaturé" complètement et très rapidement parce que ses brins complémentaires sont maintenus à proximité l'un de l'autre par l'intermédiaire des ions métalliques M^{++}.

L'état "dénaturé" étant ainsi bloqué, il faut que les ions M^{++} quittent le DNA pour qu'il puisse être "renaturé". Par conséquent, la transformation :

DNA "dénaturé" $\rightleftharpoons$ DNA "renaturé"

est dépendante de la transformation

$$DNA - M^{++} \rightleftharpoons DNA + M^{++}$$

L'étude phénoménologique montrant que la fonction $\alpha = \varphi(t)$ est la même qu'elle soit mesurée par le dosage des ions M^{++} ou l'hypochromicité, il s'ensuit que l'expérience ne révèle que l'étape la plus lente (Ch. IV-2) à savoir la libération des ions M^{++}.

Finalement plus est grande la quantité d'ions M^{++} fixés et leur affinité sur les sites, plus la vitesse de transformation est faible.

On peut à partir de là interpréter l'influence des différentes variables conditionnant l'évolution du système. La discussion est donnée synoptiquement en prenant plus particulièrement pour exemple le cas des ions Cu^{++} qui a fait l'objet des études les plus complètes et en réservant aux ions Zn^{++} la discussion sur Δ et μ'.

	Variables ↗	⟹	Raison	Conséquences sur la vitesse	Vitesse expérimentale
SYSTEME EN FAIBLE FORCE IONIQUE	$\frac{G-C}{A-T}$	Cu^{++} fortement fixé ↗	K de complexation de G > K de complexation de A (54)	↘	↘
	a	Cu^{++} fixé ↗	DNA + Cu^{++} ⇌ DNA - Cu^{++}	↘	↘
	μ'	Zn^{++} fixé ↘	Compétition entre Na^{+} et Zn^{++} au niveau des phosphates	↗	↗
	Δ	Zn^{++} fixé ↗	La réaction de complexation est lente et l'état d'équilibre n'est probablement atteint qu'au-delà d'une heure (Δ limite)	↘	↘
	T_1	Cu^{++} fixé ↗ à Δ donné	La vitesse de fixation est certainement une fonction croissante de T_1 (Loi d'Arrhénius)	↘	↘
	θ	a) Δ < Δ limite (cas de nos expériences) b) Δ > Δ limite	La complexation continue mais plus lentement puisque $T_2 < T_1$, donc Cu^{++} fixé ↗ α) L'enthalpie d'association ΔH > 0 : Le passage de T_1 à T_2 entraîne une augmentation des ions Cu^{++} fixés β) L'enthalpie d'association ΔH < 0 : Le passage de T_1 à T_2 entraîne une diminution des ions Cu^{++} fixés	↘ ↘ ↗	↘ Une expérimentation préliminaire indique ↘
SYSTEME EN FORCE IONIQUE ELEVEE	μ	Cu^{++} fixé ↘	Compétition entre Na^{+} et Cu^{++}	↗	↗
	T_2	Cu^{++} fixé ↘	La vitesse de complexation croît avec la température (Loi d'Arrhénius)	↗	↗

4) *Relation entre ce mécanisme et la loi* $\alpha = \varphi(t)$ *(Ch. VII)*

Le mécanisme que nous venons d'exposer implique que la seule transformation qui soit suivie est :

$$DNA - Cu^{++} \rightleftharpoons DNA + Cu^{++}$$

La transformation structurale du DNA est trop rapide pour que les techniques utilisées puissent en rendre compte. La réaction précédente est donc du type :

$$AB \rightleftharpoons A + B$$

Dans une première démarche on peut envisager qu'elle soit bimoléculaire ; ceci lui confère évidemment un ordre 2. Or c'est effectivement ce qui est constaté avec une précision qui fut auparavant discutée (Ch. VII).

Il y a donc compatibilité entre le modèle proposé, le mécanisme envisagé et les résultats quantitatifs déduits de la phénoménologie et de la cinétique formelle.

CONCLUSION

Dans le cadre d'une étude phénoménologique générale de l'évolution des systèmes nous avons choisi le système DNA en présence de certains ions, parce que la "renaturation" après "dénaturation" d'un tel système a l'avantage d'être influencée par de nombreuses variables, ce qui n'est pas le cas de la plupart des systèmes chimiques (variables P, T, n_i).

Ayant choisi un système, nous l'avons fait évoluer en modifiant une des variables et en maintenant les autres constantes. Nous avons répété ceci, d'une part avec un même système en modifiant tour à tour des variables que nous avions dénombrées, puis de la même manière nous avons, d'autre part, étudié des systèmes voisins du premier système choisi. Enfin, nous avons suivi l'évolution d'un même système en fonction des mêmes variables mais à l'aide de propriétés différentes. Chaque propriété a été choisie afin de suivre l'évolution de chacun des constituants du système.

Ce faisant, nous avons tout d'abord vérifié la règle phénoménologique d'évolution des systèmes, c'est-à-dire que nous avons pu grouper un grand nombre de courbes d'évolution en une courbe "unique" $\alpha = \varphi(t)$ et déterminer les fonctions $\text{Log } k_{p_i} = f(p_i)$ décrivant l'influence des variables p_i sur la vitesse d'évolution du système.

Nous avons ensuite évalué la précision de nos expériences afin de voir dans quelle mesure certaines courbes étaient comparables.

Puis nous avons discuté les résultats et leur analyse phénoménologique. Nous avons constaté qu'à condition de prendre quelques précautions d'ordre technique, des DNA issus de sources différentes évoluent suivant la même loi. Mais ce qui nous parait beaucoup plus important, c'est la mise en évidence à l'aide de deux propriétés différentes de deux sous-systèmes évoluant suivant des vitesses très différentes.

Ces deux conclusions ont été très utiles lors de l'élaboration des modèles de fixation des ions sur le DNA et du mécanisme de la transformation étudiée.

Cette étude phénoménologique étant faite, nous avons mis en évidence la fixation des ions sur les bases du DNA, en considérant celui-ci dans les différents états d'équilibre précédant et suivant son évolution. Les méthodes utilisées n'ont pas indiqué avec précision la nature des sites.

En utilisant à la fois les déductions de la phénoménologie, celles des méthodes d'étude structurales du DNA et en tenant compte de l'ensemble des travaux antérieurs nous avons proposé un modèle qui explique de façon satisfaisante le mécanisme de la réaction que nous avions choisi d'étudier : à savoir, la "renaturation" du DNA "dénaturé" en présence d'ions Cu^{++} ou Zn^{++}.

- Bibliographie -

1 - D.M. BROWN, A.R. TODD, The Nucleic Acids, Academic press - New-York, p. 409 (1955)

2 - R. LANGRIDGE, H.R. WILSON, C.W. HOOPER, M.H.F. WILKINS, L.D. HAMILTON, J. Mol. Biol. 2, 19 (1960)

3 - R. LANGRIDGE, D.A. MARVIN, W.E. SEEDS, M.R. WILSON, C.W. HOOPER, M.H.F. WILKINS, L.D. HAMILTON, J. Mol. Biol. 2, 38 (1960)

4 - D.A. MARVIN, M. SPENCER, M.H.F. WILKINS, L.D. HAMILTON, J. Mol. Biol., 3, 547 (1961)

5 - W. FULLER, M.H.F. WILKINS, H.R. WILSON, L.D. HAMILTON, J. Mol. Biol. (1963)

6 - V. LUZZATI - Progress in Nucleic Acid Research, Vol 1, p. 347 - Academic Press - New-York (1962)

7 - V. LUZZATI, A. MATHIS, F. MASSON, J. WITZ, J. Mol. Biol. 10, 28-41 (1964)

8 - M.H.F. WILKINS, J.T. RANDALL, Biochim. Biophys. Acta 10, 192 (1953)

9 - M.H.F. WILKINS, G. ZUBAY, H.R. WILSON, J. Mol. Biol. 1, 179 (1959)

10 - A. RICH, A.C.T. NORTH, Nature, 191, 1242 (1961)

11 - C. BROT, H. SZWARC, J. Chim. Phys. 60, 671 (1963)

12 - W. FULLER - Sc. Profr. (London), 521, 26-41 (1964)

13 - C. SADRON - XIème Réunion Annuelle de la Société de Chimie Physique - 26-30 juin (1961)

14 - G.L. EICHHORN, Y.A. SHIN, J. Am. Chem. Soc. 90, 7323 (1968)

15 - A. PACAULT, C.R. Acad. Sc., 268, 383-386 (1969)

16 - S. HIAI, J. Mol. Biol., 11, 672-691 (1965)

17 - G.L. EICHHORN, P. CLARK, Proc. N.A.S., 53, 586 (1965)

18 - G.L. EICHHORN, P. CLARK, E.D. BECKER, Biochemistry, 5(1), 245 (1966)

19 - Y.A. SHIN, G.L. EICHHORN, Biochem., 7, 1026 (1968)

20 - J. MARMUR, R. ROWND, C.L. SCHILDKRAUT - Progress in Nucleic Acid Research - Vol.1, 232 - Academic press - New-York

21 - E.P. GEIDUSCHEK, T.T. HERSKOVITS - Archives of Biochemistry and Biophysics, 95, 114-129 (1961)

22 - K. HAMAGUCHI, E.P. GEIDUSCHEK, J. A.C.S., 84, 1329 (1962)

23 - R. THOMAS - Actualités biochimiques - 21, 29 (1962) - Masson et Cie Editeurs - Paris

24 - J. MARMUR, P. DOTY, Nature, 188, 1427 (1959)

25 - H.R. MAHLER, B.K.D. MEHROTRA, C.N. SHARP, Biochem. Biophys. Res. Comm., 4, 79 (1961)

26 - G. WEIL, Ecole d'été (Les Houches) (1969)

27 - I. TINOCO, Jr., J. Chim. Phys. Physicochim. Biol., 65(1), 91-97 (1968)

28 - F. KLOTZ - Thèse de 3ème cycle (sous presse)

29 - H. RICHARD, A. PACAULT, Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 417 (1968)

30 - H. RICHARD, A. PACAULT, C.R. Acad. Sc., 268, 1650-1653 (1969)

31 - H. RICHARD, E. DUPART, C.R. Acad. Sc., 269, 89-92 (1969)

32 - R.J. BRITTEN, D.E. KOHNE, Science, 161, 529 (1968)

33 - E. FRIEDEN, J. ALLES - J. Biol. Chem., 230, 797 (1958)

34 - A. ALBERT, Biochem. J., 54, 646 (1953)

35 - A. ALBERT, Biochem. J., 76, 621 (1961)

36 - M. COHN, T.R. HUGUES, Jr., J. Biol. Chem. 237, 176 (1962)

37 - C. ROPARS, R. VIOVY, J. Chim. Phys., 62, 408 (1965)

38 - R.G. SCHULMAN, H. STERNLICHT, J. Mol. Biol., 13, 952 (1965)

39 - H. BRINTZINGER, B.B.A., 77, 343 (1963)

40 - PING-YAO-CHENG - Biochim. Biophys. Acta 102, 314-316 (1965)

41 - J.H. COATES, D.O. JORDAN, V.K. SRIVASTAVA, Biochem. Biophys. Res. Comm. 20, 611 (1965)

42 - H. VENNER, Ch. ZIMMER, Biopol. 4, 321-335 (1966)

43 - D. BACH, I.R. MILLER, Biopol. 5, 161-172 (1967)

44 - I.E. MINCHENKOVA, V.I. IVANOV, Biopol. 5, 615-625 (1967)

45 - C. ROPARS, R. VIOVY, C.R. Acad. Sc., 257, 3499-3501 (1963)

46 - C. ROPARS, R. VIOVY, C.R. Acad. Sc., 258, 731-734 (1964)

47 - J.P. SCHREIBER, M. DAUNE, C.R. Acad. Sc., 264, 1822-1824 (1967)

48 - J.P. SCHREIBER, M. DAUNE, Biopol. 8, 139 (1969)

49 - M. DAUNE, J. CHAMBRON, J. Chim. Phys., 65, 72 (1968)

50 - S.E. BRYAN, E. FRIEDEN, Biochem. 6, 2728 (1967)

51 - M. DAUNE, Biopol., 7, 659 (1968)

52 - M. DAUNE, Ecole de Roscoff (1970)

53 - M. DAUNE et Coll. (Communication privée)

54 - Ch. ZIMMER, H. VENNER, Eur. J. Biochem., 15, 40-47 (1970)

Vu et approuvé

Bordeaux, le 1970

Le Président du Conseil Transitoire de Gestion,

A. MARCHAND